



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE MAR DEL PLATA**

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

**“CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS CÉLULAS  
INTERSTICIALES DE CAJAL Y ANÁLISIS DE GLICOPROTEÍNAS  
EN EL INTESTINO DE LA VIZCACHA DE LLANURA, *Lagostomus  
maximus*”**

Doctorando: Lic. María Florencia Tano de la Hoz

Director: Dra. Alcira Ofelia Díaz

Co-director: Dra. Mirta Alicia Flamini

Trabajo de tesis realizado como requisito para optar al título de  
Doctor en Ciencias. Área Biología

Laboratorio de Histología e Histoquímica, Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras  
(IIMyC), Universidad Nacional de Mar del Plata, CONICET, FCEyN, Departamento de  
Biología, Mar del Plata, Argentina



I I M Y C

**2017**

## AGRADECIMIENTOS

▪ En primer lugar, deseo agradecer a mis directoras, la Dra. Alcira Díaz y la Dra. Alicia Flamini, por haberme guiado durante el desarrollo de esta tesis. A Alcira por su constante dedicación en mi formación científica y por su buena predisposición siempre que la he necesitado, tanto a nivel profesional como personal. A Alicia quiero agradecerle porque siempre me acompañó y motivó en cada instancia de esta tesis. Gracias además por facilitarme las muestras que fueron imprescindibles para la realización de este trabajo y por haberme enseñado tanto cada vez que fui a trabajar a la Facultad de Cs. Veterinarias. Gracias porque he aprendido mucho de las dos, estaré por siempre agradecida.

▪ A las autoridades de la Estación de Cría de Animales Silvestres (Ministerio de Agroindustria de la Provincia de Buenos Aires) por proveer el material biológico necesario para completar las muestras.

▪ A los miembros del jurado, Dra. Bibiana Dallard, Dr. Claudio Barbeito y Dr. Aldo Vassallo, por sus valiosos aportes.

▪ Al Dr. Enrique Portiansky por su asesoramiento y colaboración en el análisis morfométrico.

▪ A la Dra. Carolina Zanuzzi por su colaboración en la puesta a punto de la técnica inmunohistoquímica.

▪ A mis queridas compañeras y amigas de laboratorio, Vivi, Gladys, Vicky, Stefi y Maru. Gracias por los mates, las risas y los abrazos cuando fueron necesarios, sin ustedes esta tesis no sería la misma. También quiero agradecer a Mabel García porque, a pesar que hace varios años que no compartimos laboratorio, siempre estuvo presente y fundamentalmente porque me enseñó mucho de lo que sé sobre procesamiento histológico. Gracias a todas por hacer que el trabajo diario sea tan placentero. Guardaré por siempre en mi corazón todos estos años compartidos.

- A todos los integrantes de la cátedra de Histología y Embriología de la Facultad de ciencias Veterinarias de la UNLP por recibirme tan amablemente cada vez que fui a trabajar a su laboratorio.

- A las Dras. Silvia Ceré y María Rosa Katunar por permitirme colaborar en sus líneas de investigación y darme la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo. En especial quiero agradecerle a María porque en los últimos años compartimos, además de horas al microscopio, hermosas charlas.

- A mis amigas, Juli Loos, Juli Fabbri, Nati, Aye y Maru por estar siempre presentes. En especial quiero agradecerle a Juli Loos por su hermosa amistad, la facultad me regaló una hermana científica sin lugar a dudas!

- A mi familia por ser el pilar de mi vida. Mi más profundo agradecimiento y admiración por cada uno de ustedes. No sería justo si sólo expreso mi gratitud por su acompañamiento durante estos años de estudio, les debo mi vida entera!

- Por último quiero agradecer a mi marido, Cristian, por su invaluable apoyo. Gracias por creer en mí, acompañarme y ayudarme tanto durante todos estos años de estudio y trabajo. Como no podía ser de otra forma, esta tesis está dedicada especialmente para vos. Por siempre, gracias!

La realización de esta tesis fue posible gracias a una beca de postgrado otorgada por CONICET, así como a subsidios entregados por UNMDP y UNLP a las Dras. Alcira Díaz y Alicia Flamini.

## **TRABAJOS PUBLICADOS CONTENIENDO ASPECTOS PARCIALES DEL PRESENTE TRABAJO DE TESIS**

- Tano de la Hoz MF, Flamini MA, Díaz AO. 2014. Histological and histochemical study of the duodenum of the plains viscacha (*Lagostomus maximus*) at different stages of its ontogenetic development. *Acta Zoologica (Stockholm)* 95: 21–31.
- Tano de la Hoz MF, Flamini MA, Díaz AO. 2016. Comparative analysis of the morphology, ultrastructure, and glycosylation pattern of the jejunum and ileum of the wild rodent *Lagostomus maximus*. *Anatomical Record* 299: 630–642.
- Tano de la Hoz MF, Flamini MA, Zanuzzi, CN, Díaz AO. 2017. The colonic groove of the plains viscacha (*Lagostomus maximus*): histochemical evidence of an abrupt change in the glycosylation pattern of goblet cells. *Journal of Morphology* 278: 1606–1618.

## TABLA DE CONTENIDOS

---

<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>7</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>8</b>
<b>PALABRAS CLAVE.....</b>	<b>9</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>10</b>
<b>KEY WORDS.....</b>	<b>11</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>12</b>
1. GENERALIDADES DEL APARATO DIGESTIVO.....	12
2. MORFOLOGÍA GENERAL DEL TUBO DIGESTIVO.....	13
3. INTESTINO DELGADO.....	16
3.1 Especializaciones de la mucosa y submucosa.....	17
3.2 Tipos celulares del epitelio intestinal.....	17
4. INTESTINO GRUESO.....	21
4.1 Características morfológicas distintivas.....	21
4.2 Tipos celulares del epitelio intestinal.....	22
5. MUCUS.....	22
5.1 Organización.....	22
5.2 Mucinas: estructura, clasificación y función.....	24
5.3 Glicocáliz.....	26
5.4 Biosíntesis y secreción de mucinas.....	27
6. MOTILIDAD INTESTINAL.....	28
7. CÉLULAS INTERSTICIALES DE CAJAL (ICC).....	29
7.1 Origen embriológico.....	29
7.2 Criterios actuales para la identificación de ICC.....	30
7.3 Clasificación y patrón de distribución en el TGI.....	33
7.4 Funciones.....	35
8. ESPECIALIZACIONES DEL TUBO DIGESTIVO A LA HERVIBORÍA.....	37
9. ROEDORES CAVIOMORFOS.....	40
<b>OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....</b>	<b>43</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>45</b>
1. ANIMALES.....	45
2. MUESTREO Y PROCESAMIENTO HISTOLÓGICO.....	46
2.1 Técnicas histológicas.....	47
2.1.1 Hematoxilina-eosina.....	47
2.1.2 Tricrómico de Masson.....	48
2.2 Técnicas histoquímicas para determinación de glicoconjugados.....	48
2.2.1 PAS.....	48
2.2.2 $\alpha$ -amilasa-PAS.....	49

2.2.3 KOH/PA*S.....	49
2.2.4 PA/Bh/KOH/PAS.....	49
2.2.5 KOH/PA*/Bh/PAS.....	49
2.2.6 Azul Alcian.....	50
2.2.7 AB/ PAS.....	50
2.2.8 Azul de Toluidina.....	50
2.3 Estudio Lectinhistoquímico.....	54
2.4 Estudio Inmunohistoquímico.....	54
3. ESTUDIO MORFOMÉTRICO.....	54
4. ESTUDIO ESTADÍSTICO.....	55
5. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN.....	55
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>57</b>
1. INTESTINO DELGADO.....	57
1.1 Características morfológicas generales.....	57
1.2 Características ultraestructurales.....	61
1.3 Histoquímica para glicoconjugados.....	67
1.4 Patrón lectinhistoquímico.....	75
1.5 Inmunohistoquímica anti-c-kit.....	80
2. INTESTINO GRUESO.....	84
2.1 Características morfológicas generales.....	84
2.2 Características ultraestructurales.....	90
2.3 Histoquímica para glicoconjugados.....	94
2.4 Patrón lectinhistoquímico.....	106
2.5 Inmunohistoquímica anti-c-kit.....	113
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>122</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>142</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>146</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>171</b>

## ABREVIATURAS

---

AB	Azul Alcian
AT	Azul de toluidina
Bh	Borohidruro de sodio
c-kit	Receptor del factor de crecimiento de células troncales con actividad tirosina-cinasa
GCs	Glicoconjugados
ICC	Células intersticiales de Cajal
ICC-CM	Células intersticiales de Cajal en la capa circular de la túnica muscular
ICC-DMP	Células intersticiales de Cajal del plexo muscular profundo
ICC-IM	Células intersticiales de Cajal en la túnica muscular
ICC-LM	Células intersticiales de Cajal en la capa longitudinal de la túnica muscular
ICC-MP	Células intersticiales de Cajal del plexo mientérico
ICC-SEP	Células intersticiales de Cajal septales
ICC-SMP	Células intersticiales de Cajal del borde submucoso del colon
ICC-SS	Células intersticiales de Cajal subserosas
MET	Microscopía electronica de transmisión
PA	Oxidación con ácido periódico
PA*	Oxidación con ácido periódico selectivo
PAS	Ácido periódico/reactivo de Schiff
PA*S	Ácido periódico/Schiff a baja temperatura y bajo pH
PBS	Buffer fosfato salino
TGI	Tracto gastrointestinal

## RESUMEN

---

En los últimos años, la vizcacha de llanura (*Lagostomus maximus*) ha sido utilizada como modelo animal debido a su importancia zootécnica y a que presenta características anatómo-fisiológicas poco frecuentes en los mamíferos euterios. El objetivo general del presente trabajo se centró en estudiar la morfología e histoquímica del tracto intestinal de *L. maximus*. Para ello, se realizó un análisis comparativo de la morfología, ultraestructura y patrón de glicosilación de diferentes segmentos del intestino delgado y grueso. Además, se caracterizó la distribución y morfometría de las células intersticiales de Cajal (ICC).

El epitelio intestinal de *L. maximus* exhibió características ultraestructurales particulares de la especie, como la complejidad estructural de los gránulos de las células de Paneth y la existencia de dos tipos de enterocitos que difieren en la electron-densidad de su citoplasma. El análisis histoquímico de glicoconjugados (GCs) mostró a lo largo del tracto intestinal un gradiente creciente de sulfomucinas y GCs polianiónicos, asociado con un gradiente decreciente de mucinas con dioles vecinos oxidables. El colon ascendente presentó a lo largo del lado mesentérico un surco colónico longitudinal que funciona como ruta de transporte retrógrado hacia el ciego de una mezcla de bacterias y mucus. Se observaron diferencias entre el patrón de glicosilación de las células caliciformes que se encuentran dentro y fuera del surco. El análisis inmunohistoquímico anti-c-kit permitió identificar diferentes subpoblaciones de ICC a lo largo del tracto intestinal de *L. maximus*. El patrón de distribución de las ICC en las distintas tunicas del tubo intestinal varió según la región anatómica estudiada.

El análisis integrado de las características morfológicas e histoquímicas del tracto intestinal de *L. maximus* permitió realizar una interpretación funcional de los tipos celulares y sustancias secretadas, aportando un mejor entendimiento de las adaptaciones morfofuncionales que emplean los herbívoros para lograr una mayor eficiencia digestiva.



## **PALABRAS CLAVES**

---

Hystriognathi, tracto intestinal, morfología, mucinas, histoquímica, células intestinales de Cajal.

## ABSTRACT

---

In recent years, the plain vizcacha (*Lagostomus maximus*) has been used as an animal model due to its zootechnical importance and because it has unusual anatomical-physiological characteristics in eutherian mammals. The general objective of this work was to study the morphology and histochemistry of the intestinal tract of *L. maximus*. For this purpose, a comparative analysis of the morphology, ultrastructure and glycosylation pattern of different segments of the small and large intestine was performed. We also studied the distribution pattern of the interstitial cells of Cajal (ICC) to evaluate their regulatory influence on gut motility.

The intestinal epithelium of *L. maximus* exhibited ultrastructural characteristics particular of the species, such as the structural complexity of the Paneth cell granules and the presence of two types of enterocytes that differ in cytoplasmic density. Histochemical analysis of glycoconjugates (GCs) showed an increasing gradient of sulfomucins and polyanionic GCs along the intestinal tract, associated with a decreasing gradient of mucins with oxidizable vicinal diols. The ascending colon presented a longitudinal colonic groove along the mesenteric side that works as a retrograde transport pathway for a mixture of bacteria and mucus toward the cecum. The GCs analysis showed differences among goblet cells in and out of the furrow. The anti-c-kit immunohistochemical analysis showed different ICC subpopulations along the intestinal tract. The pattern of distribution of the ICC in the different layers of the intestinal tube varied according to different anatomical regions.

The integrated analysis of the morphological and histochemical characteristics of the intestinal tract of *L. maximus* allowed us to perform a functional interpretation of cell types and secreted substances, providing a better understanding of the morphofunctional adaptations used by herbivores to achieve greater digestive efficiency.

## **KEY WORDS**

---

Hystriognathi, intestinal tract, morphology, mucins, histochemistry, interstitial cells of Cajal.

## INTRODUCCIÓN

---

### 1. GENERALIDADES DEL APARATO DIGESTIVO

En los mamíferos, el aparato digestivo está formado por el tubo digestivo y las glándulas digestivas extramurales.

Al pasar por el tubo digestivo, los alimentos se degradan física y químicamente para que los productos de esa degradación puedan ser absorbidos y distribuidos por la circulación a los distintos tejidos. El alimento no digerido se excreta con las heces como productos de desecho junto con bacterias, células descamadas y pigmentos biliares. De esta manera, las principales funciones del tubo digestivo comprenden la propulsión de los alimentos ingeridos por la actividad motora de su pared; la secreción de enzimas digestivas, hormonas y anticuerpos; la digestión y la absorción de los productos digeridos y la excreción de los detritos no digeribles (Kardong, 2007; Isackson y Ashley, 2014).

En la mayor parte de los mamíferos, el tubo digestivo se extiende desde el extremo proximal del esófago hasta el extremo distal del conducto anal y está formado por una serie de órganos tubulares de diámetro variable. La pared de este tubo o canal alimentario está compuesta por cuatro túnicas bien definidas que presentan características histológicas comunes en toda su longitud. Las túnicas de la pared son, en orden desde la luz del órgano: mucosa, submucosa, muscular y serosa o adventicia (Kardong, 2007).

Si bien los órganos que conforman el tubo digestivo tienen la misma organización estructural básica, la morfología de su pared difiere de manera considerable. Esto se debe a que los diferentes segmentos están especializados morfológicamente para cumplir con aspectos específicos de la digestión y absorción (Pawlina, 2015). En particular, las principales diferencias se presentan en la túnica más interna que reviste la luz del órgano denominada túnica mucosa (Fig. I).

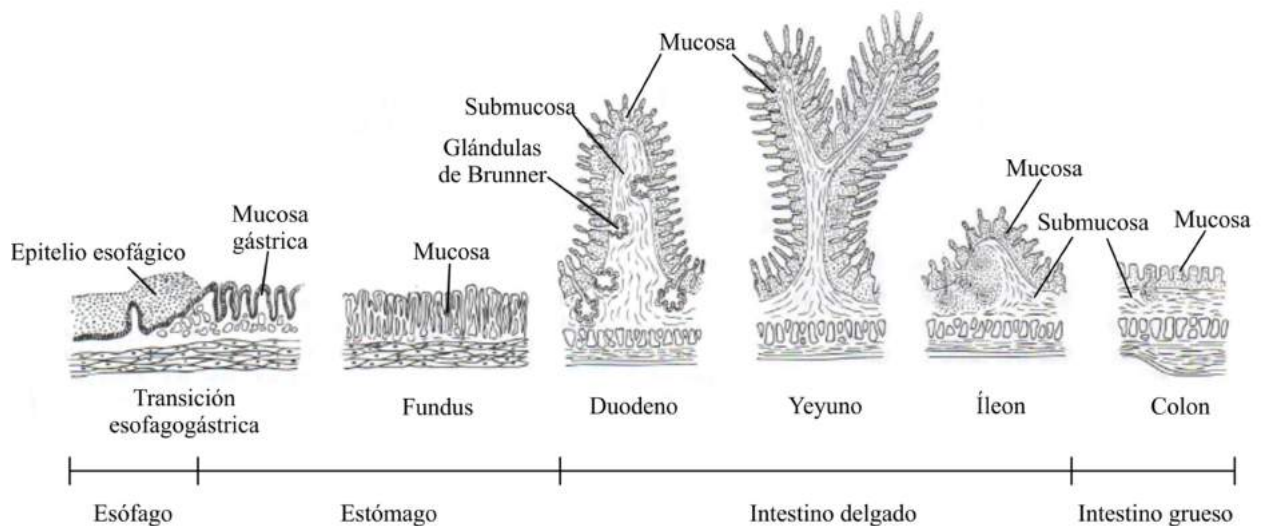


Fig. I. Histología comparada de la mucosa a lo largo del tubo digestivo (Adaptado de Kardong, 2007).

## 2. MORFOLOGÍA GENERAL DEL TUBO DIGESTIVO

### 2.1 Mucosa

La túnica mucosa está formada por un epitelio de revestimiento superficial, una lámina propia de tejido conjuntivo y una capa de células musculares lisas denominada muscular de la mucosa (Fig. II).

El epitelio de revestimiento forma una barrera de permeabilidad selectiva que separa el medio luminal del tubo digestivo de los tejidos subyacentes. De esta manera, protege al organismo de la abrasión física producida por los alimentos ingeridos y de la entrada de antígenos, patógenos y sustancias nocivas. Además, permite la absorción de los productos de la digestión, el agua y los electrolitos (Turner, 2009; Howe et al., 2014).

La lámina propia se compone de tejido conjuntivo laxo que contiene vasos sanguíneos y linfáticos de pequeño calibre. Los vasos sanguíneos son de tipo fenestrado y recolectan la mayoría de los metabolitos absorbidos (Hosoyamada y Sakai, 2007). Además, esta capa subepitelial presenta acumulaciones locales de tejido linfático difuso y linfonódulos que protegen al organismo contra los agentes patógenos y son el sitio de la respuesta inmunitaria inicial

(Hamada et al., 2002; Kamada et al., 2013). Por su relación con las membranas mucosas del tubo digestivo, este tejido linfático recibe el nombre de tejido linfático asociado con el intestino (GALT). En toda la longitud del tubo, la lámina propia puede presentar glándulas que derivan de invaginaciones del epitelio luminal. Los diversos productos de secreción consisten en moco, enzimas digestivas, hormonas y anticuerpos, entre otras sustancias que lubrican la mucosa y contribuyen a la digestión (McGuckin et al., 2011; Walters et al., 2014; Pereira et al., 2016).

La muscular de la mucosa es la capa más externa de la túnica mucosa y está compuesta por células musculares lisas que forman dos capas concéntricas, la más interna de disposición circular y la externa con organización longitudinal. La contracción de este músculo genera crestas y depresiones en la mucosa que facilitan los procesos de absorción y secreción. El movimiento de la mucosa es independiente de las contracciones peristálticas de toda la pared del tubo digestivo (Hosoyamada y Sakai, 2007).

## **2.2 Submucosa**

La submucosa, formada por tejido conjuntivo denso no modelado, contiene vasos sanguíneos que envían ramas hacia las otras túnicas del tubo digestivo. Además, esta túnica presenta vasos linfáticos y un plexo submucoso, también llamado plexo de Meissner, formado por una red de fibras nerviosas amielínicas y células ganglionares (Sasselli et al., 2012).

En algunas partes del tubo digestivo, la submucosa contiene acumulaciones de glándulas que, entre otras funciones, lubrican y protegen la superficie luminal (Krause, 2000; Collaco et al., 2013). Estas glándulas submucosas secretan sus productos hacia la luz del tubo a través de conductos epiteliales que están comunicados con la superficie (Fig. II). Con frecuencia, la presencia y las características morfológicas de estas glándulas ayudan a identificar con precisión un segmento específico del tubo digestivo.

## **2.3 Muscular**

En la mayoría de los órganos del tubo digestivo, la túnica muscular está formada por dos capas de células musculares lisas. Las células de la capa interna presentan una orientación circular, mientras que las de la capa externa se organizan formando un estrato de orientación longitudinal (Fig. II). En varios puntos a lo largo del tubo digestivo, la capa circular interna está engrosada para formar esfínteres o válvulas que regulan el paso del contenido luminal.

Entre las dos capas musculares hay una delgada lámina de tejido conjuntivo que contiene el plexo mientérico o plexo de Auerbach. Este plexo está compuesto por los somas de neuronas parasimpáticas posganglionares, neuronas sensitivas e interneuronas que regulan la contracción de la túnica muscular (Brookes, 2001; Sasselli et al., 2012). Los movimientos peristálticos, generados por la contracción de ambas capas musculares, se caracterizan por la constricción y el acortamiento de los distintos órganos. Estas contracciones rítmicas lentas mezclan e impulsan el contenido luminal a lo largo del tubo digestivo (Furness, 2012).

La morfología de la túnica muscular presenta variaciones en algunas regiones del tubo digestivo (Kardong, 2007). Estos cambios en la estructura y organización del tejido muscular responden a las actividades digestivas y motoras específicas de cada órgano.

## **2.4 Adventicia y serosa**

La adventicia es la capa más externa y está formada por una pequeña cantidad de tejido conjuntivo fibroso. En el caso de los órganos que están suspendidos en la cavidad abdominal, es decir que no están adheridos directamente a estructuras contiguas, en lugar de adventicia hay una serosa (Pawlina, 2015).

La serosa (peritoneo visceral) es una membrana compuesta por un epitelio simple plano llamado mesotelio y una pequeña cantidad de tejido conjuntivo subyacente (Fig. II). Esta túnica es contigua tanto con el mesenterio como con el revestimiento de la cavidad abdominal

(peritoneo parietal). El tejido conjuntivo de la serosa contiene abundantes capilares sanguíneos y vasos linfáticos, como así también puede presentar cantidades variables de células adiposas uniloculares. Por lo general, el tejido conjuntivo que limita directamente con la túnica muscular recibe el nombre de capa subserosa (van Baal et al., 2017).

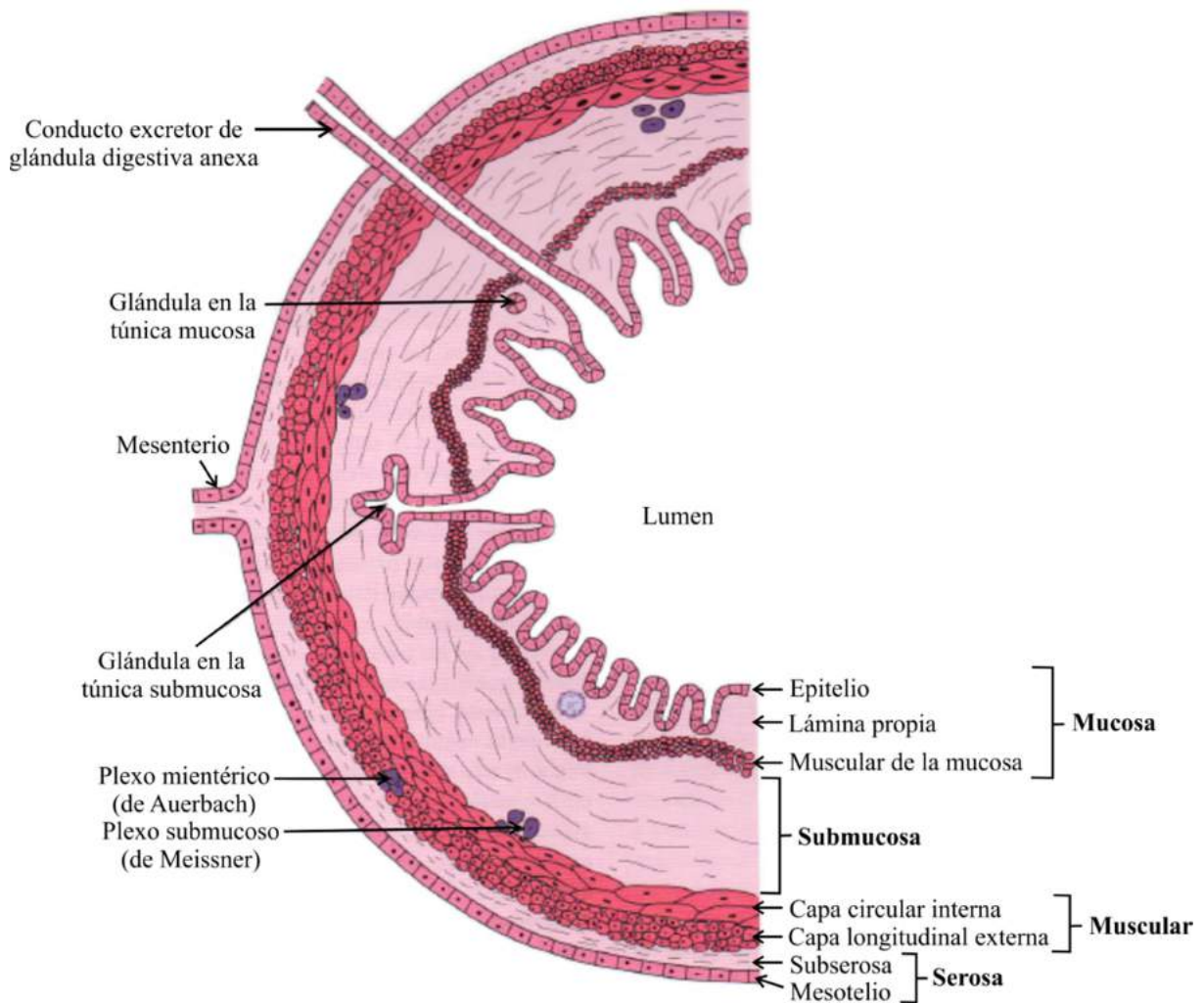


Fig. II. Esquema de la estructura histológica general del tubo digestivo (Adaptado de Brüel et al., 2015).

### 3. INTESTINO DELGADO

En los mamíferos, el intestino delgado está dividido en tres porciones anatómicas: duodeno, yeyuno e íleon. El duodeno recibe el quimo del estómago y secreciones exócrinas de glándulas extramurales, principalmente del hígado y del páncreas.



### **3.1 Especializaciones de la mucosa y submucosa**

La superficie absortiva del intestino delgado se amplifica por especializaciones de las células epiteliales y de los tejidos que conforman las tunicas mucosa y submucosa.

Los enterocitos o células absortivas del epitelio intestinal presentan microvellosidades (prolongaciones citoplasmáticas digitiformes) en su membrana apical que producen la principal amplificación de la superficie luminal.

Un aumento adicional de la superficie absortiva de la mucosa intestinal se logra mediante proyecciones digitiformes o foliáceas de la mucosa que se extienden dentro de la luz intestinal, denominadas vellosidades (Komuro y Hashimoto, 1990). Éstas consisten en un centro de tejido conjuntivo laxo cubierto por un epitelio cilíndrico simple (Tootian et al., 2013). El centro de la vellosidad también presenta células musculares lisas derivadas de la muscular de la mucosa que reciben el nombre de músculo de Brucke. Las vellosidades cubren por completo la superficie luminal del intestino delgado y le imparten un aspecto aterciopelado cuando se la examina macroscópicamente (Hosoyamada y Sakai, 2007).

Por último, la extensión de la superficie absortiva del órgano se amplifica por la presencia de pliegues circulares o válvulas conniventes. A diferencia de las vellosidades, las válvulas conniventes son repliegues transversales permanentes que contienen un centro de submucosa. Por lo tanto, en la formación de estos pliegues participan tanto la mucosa como la submucosa intestinal. En general, las válvulas conniventes son muy abundantes en la porción distal del duodeno y en el inicio del yeyuno, siendo menos frecuentes a partir del tercio medio del íleon (Pawlina, 2015).

### **3.2 Tipos celulares del epitelio intestinal**

Las células maduras del epitelio se localizan tanto en la superficie de las vellosidades como en las glándulas intestinales o criptas de Lieberkühn. Las glándulas son estructuras tubulares

simples que se extienden desde la muscular de la mucosa a través de todo el espesor de la lámina propia y desembocan en la superficie luminal del intestino a la altura de la base de las vellosidades. El epitelio que recubre las vellosidades es continuo con el epitelio de las glándulas intestinales y está compuesto por enterocitos, células caliciformes y células enteroendocrinas, mientras que las criptas de Lieberkühn contienen un cuarto tipo celular denominado célula de Paneth (Crosnier et al., 2006; Takashima et al., 2013). Además, en las criptas de Lieberkühn se localizan dos tipos de células madre intestinales pluripotenciales denominadas LRC y ASC por sus siglas en inglés “label retaining cell” y “active stem cell”, respectivamente. Las células madre LRC se localizan en las paredes laterales de las criptas, mientras que el otro tipo celular se ubica en la base de la glándula junto con las células de Paneth (Takashima et al., 2013). Diversos estudios han demostrado mediante experimentos de marcado con timidina tritiada o BrdU (bromo-desoxiuridina), que la progenie de ambos tipos de células madre, denominadas células transitorias amplificadoras, migran inicialmente hacia el tercio medio de la cripta para luego de varias divisiones celulares diferenciarse en uno de los cuatro tipos de células maduras (Aiken y Roth, 1992; Bjerknes y Cheng, 2006). Las células destinadas a convertirse en enterocitos, células caliciformes y células enteroendocrinas continúan su diferenciación y maduración mientras migran a lo largo del eje cripta-vellosidad hacia la superficie de la luz intestinal. Una vez que alcanzan los extremos de las vellosidades, estas células sufren apoptosis y se exfolian hacia la luz (Bullen et al., 2006; Günther et al., 2013). En cambio, las células amplificadoras transitorias que se diferenciarán en el cuarto tipo celular (célula de Paneth) migran hacia la profundidad de la cripta donde finalmente permanecen (Fig. III).

### **3.2.1 Enterocitos o células absortivas.**

Los enterocitos son células cilíndricas altas especializadas para el transporte de sustancias desde la luz del intestino hacia los capilares fenestrados de la lámina propia (Howe et al., 2014).

Si bien la función absorbiva es el principal rol de los enterocitos, estas células también sintetizan y secretan las enzimas necesarias para la digestión terminal y la absorción de sustancias específicas. Además, transportan inmunoglobulina A desde la lámina propia hacia la luz intestinal mediante un proceso denominado transcitos (Hansen et al., 1999; Tuma y Hubbard, 2003; Peterson et al., 2007).

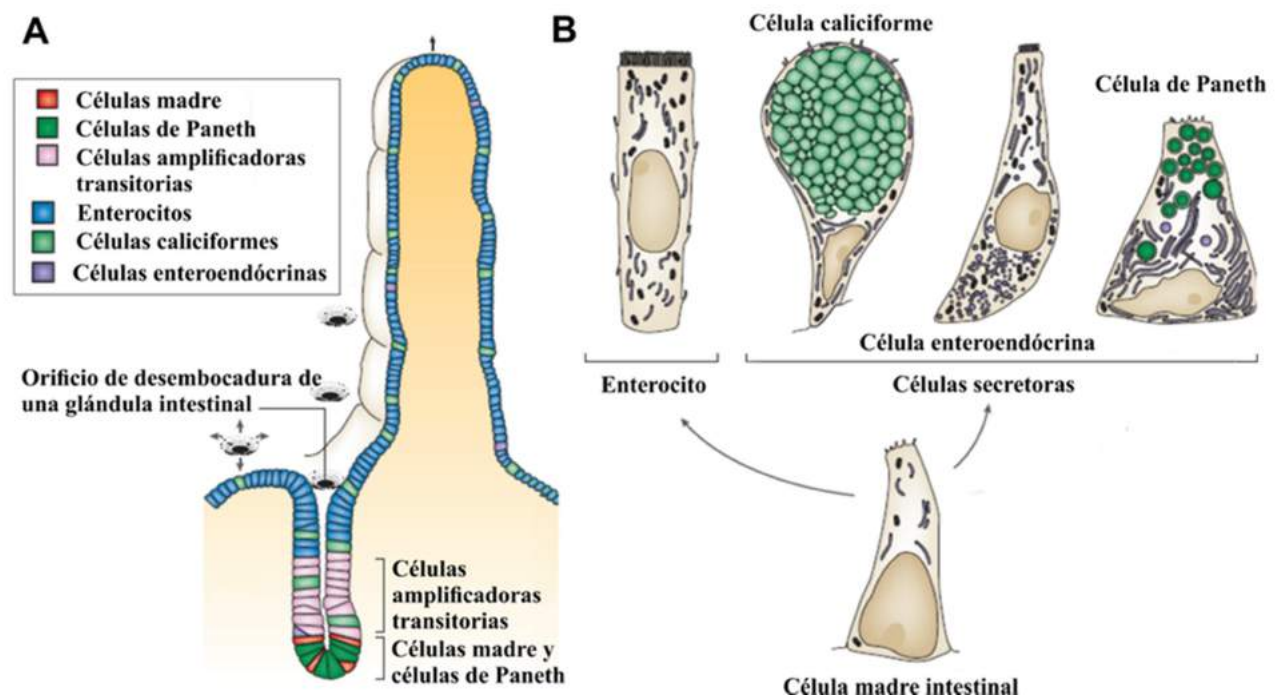


Fig. III. Distribución de los tipos celulares del epitelio intestinal a lo largo del eje cripta-vellosidad. (A) Esquema de una vellosidad y una cripta de Lieberkühn. Nótese que las flechas indican la dirección en la que migran las células destinadas a convertirse en enterocitos, células caliciformes y enteroendocrinas. (B) Esquema de células epiteliales maduras del intestino delgado (Adaptado de Crosnier et al., 2006).

### 3.2.2 Células caliciformes.

Las células caliciformes son glándulas unicelulares secretoras de mucus. Además de la síntesis y secreción de mucosustancias, este tipo celular del epitelio intestinal secreta proteínas tales como factor trébol intestinal (TFF3), molécula similar a la resistina  $\beta$  (RELM $\beta$ ) y proteínas de unión a Fc (FCGBP) que estabilizan los polímeros de mucinas y regulan su secreción (Taupin y Podolsky, 2003; Dharmani et al., 2009; Kim y Ho, 2010).

Estudios recientes han demostrado que estas células también son capaces de transportar antígenos lumbinales de bajo peso molecular hacia la lámina propia donde pueden ser captados por células dendríticas CD103<sup>+</sup> (McDole et al., 2012; Howe et al., 2014). Estos resultados sugieren que las células caliciformes podrían desempeñar un rol clave en la homeostasis inmunológica del tracto intestinal.

### **3.2.3 Células enteroendocrinas**

Las células enteroendocrinas migran lentamente a lo largo de las glándulas intestinales, pudiendo aparecer a cualquier altura del eje cripta-vellosidad. A pesar de que sólo comprenden aproximadamente el 1% de las células que recubren el lumen intestinal, en los mamíferos representan la mayor población de células productoras de hormonas (Schonhoff et al., 2004).

Las diversas hormonas peptídicas producidas por estas células controlan importantes funciones fisiológicas del sistema digestivo tales como la secreción exocrina del páncreas, el crecimiento y la reparación del epitelio intestinal, la motilidad de la pared del tubo gastrointestinal y el vaciado gástrico. Las células enteroendocrinas también producen hormonas paracrinas, tales como la somatostatina y la histamina, que regulan la secreción electrogénica de iones y la motilidad intestinal (Gunawardene et al., 2011).

### **3.2.4 Células de Paneth**

Las células de Paneth son el único tipo celular del epitelio intestinal que permanece en la base de las glándulas de Lieberkühn cerca de las células madre de las que deriva (Takashima et al., 2013). Se caracterizan por poseer gránulos de secreción apicales que contienen sustancias con propiedades antimicrobianas, tales como defensinas ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\theta$ ), lisozima, fosfolipasa A2 y la proteína RegIIIa, entre otras (Bevins, 2004; Vaishnava et al., 2011; Clevers y Bevins, 2013).

En los últimos años, también se ha demostrado que las células de Paneth son capaces de detectar bacterias entéricas a través de receptores de tipo Toll (TLR). La estimulación de los TLR desencadena la expresión de múltiples factores antimicrobianos, inhibiendo el acceso de los patógenos a los nichos de replicación (Vaishnava et al., 2008). Esta acción antimicrobiana y su capacidad para fagocitar ciertas bacterias y protozoos indican que las células de Paneth desempeñan un papel en la regulación de las bacterias comensales y patógenas del intestino delgado (Garabedian et al., 1997; Porter et al., 2002; Pawlina, 2015).

#### **4. INTESTINO GRUESO**

El intestino grueso comienza a nivel de la válvula íleocecal y comprende el ciego, el colon, el recto y el conducto anal. El colon se divide a su vez de acuerdo con su ubicación anatómica en colon ascendente, transverso, descendente y sigmoide.

En algunas especies de mamíferos, el ciego presenta un apéndice vermiforme cuya característica más conspicua es la gran cantidad de linfonódulos que se extienden dentro de la túnica submucosa (Smith et al., 2009). Recientemente, se ha propuesto que el apéndice vermiforme proporciona un ambiente adecuado para el crecimiento de bacterias comensales. Estas bacterias actuarían como reservorio para la re-inoculación del colon en caso de que el contenido del tracto intestinal se purgue después de la exposición a agentes patógenos (Bollinger et al., 2007; Smith et al., 2013).

##### **4.1 Características morfológicas distintivas**

Si bien las cuatro túnicas características del tubo digestivo aparecen en todas las regiones anatómicas del intestino grueso, este órgano presenta a nivel macroscópico rasgos distintivos.

A diferencia del intestino delgado, la mucosa del intestino grueso tiene una superficie lisa sin vellosidades intestinales ni válvulas conniventes. Por otro lado, en la mayoría de los mamíferos la túnica muscular del ciego y el colon también exhibe características particulares al presentar

tres bandaletas gruesas equidistantes que reciben el nombre de tenias del colon (Sahd et al., 2017). Entre las tenias, la superficie externa de ambos órganos presenta abollonaduras o saculaciones denominadas haustras. Además, la serosa presenta, principalmente en el ciego, pequeñas proyecciones adiposas que reciben el nombre de apéndices epiploicos u omentales (Kotzé et al., 2010).

## **4.2 Tipos celulares del epitelio intestinal**

La superficie del intestino grueso y las glándulas intestinales están revestidas por un epitelio cilíndrico simple que contiene células absortivas, caliciformes y enteroendocrinas pero que normalmente carece de células de Paneth (Crosnier et al., 2006). Al igual que en el intestino delgado, todas las células maduras del epitelio derivan de células madre ubicadas en la base de las glándulas de Lieberkühn.

El número de células caliciformes aumenta a lo largo del eje próximo-distal del tracto intestinal (Johansson et al., 2011a; Pawlina, 2015).

Por otro lado, la población de células enteroendocrinas del intestino grueso de la mayoría de los mamíferos es generalmente menos diversa que la del intestino delgado (Rindi et al., 2004; Fakhry et al., 2017).

## **5. MUCUS**

### **5.1 Organización**

En los mamíferos, la mucosa del tracto intestinal está expuesta a una abrasión física continua causada por los alimentos ingeridos; a su vez la liberación de sustancias que contribuyen a la digestión como enzimas, ácido clorhídrico, hormonas peptídicas y ácidos biliares crean un entorno potencialmente hostil para la única capa de células epiteliales que separa la luz del tubo digestivo del resto del organismo (Ermund et al., 2013). Como sistema de defensa, el epitelio

intestinal está cubierto por al menos una capa de mucus que es sintetizado y secretado principalmente por las células caliciformes.

En los últimos años, se ha demostrado que las propiedades de las mucosustancias secretadas y su organización varían a lo largo del tracto intestinal (Pelaseyed et al., 2014). En el intestino delgado el mucus forma una única capa que puede ser penetrada por bacterias y, por lo general, cubre las vellosidades intestinales, mientras que en el intestino grueso se organiza en dos capas. La capa interna se encuentra firmemente unida al epitelio, carece de bacterias y está densamente empaquetada (Johansson et al., 2008, 2011b; Vaishnava et al., 2011). Por el contrario, la capa externa es fácilmente removible, tiene un volumen expandido y se encuentra colonizada por bacterias comensales (Fig. IV).

Estudios proteómicos han demostrado que en el intestino grueso las capas interna y externa del mucus tienen una composición proteica similar, siendo la mucina Muc2 el componente estructural principal de ambas capas (Larsson et al., 2009; Johansson et al., 2009, 2011b). Johansson et al. (2008) han demostrado que la capa interna del mucus colónico muestra un aspecto compacto que bloquea físicamente el ingreso de las bacterias. En cambio, la capa externa se caracteriza por estar expandida de 4 a 5 veces en volumen debido a la actividad de proteasas endógenas que actúan sobre la mucina MUC2. Esta expansión permite que las bacterias entren en la capa externa del moco, creando un hábitat para la microbiota intestinal.

Las bacterias comensales tienen una alta proporción de sus genomas dedicados a las enzimas involucradas en la degradación de los glicanos, denominadas exoglicosidasas (van Passel et al., 2011). Los monosacáridos obtenidos de la digestión del alimento son utilizados por las bacterias comensales como fuente de energía junto con los carbohidratos no digeridos (Kim y Ho, 2010). En ambos casos, los monosacáridos liberados se convierten en ácidos grasos de cadena corta, por el metabolismo bacteriano, que pueden difundir a través de la capa interna de mucus y ser utilizados por el huésped.

Dado que en algunos trabajos se ha demostrado que el patrón de glicosilación de las mucinas intestinales no varía entre individuos de una misma especie, algunos autores han propuesto recientemente que dicho patrón puede actuar como un mecanismo de selección de la microbiota intestinal (Larsson et al., 2009; Hansson, 2012). Sin embargo, otras investigaciones han expuesto que el patrón de glicosilación del tracto intestinal es susceptible a alteraciones al describir cambios en el perfil histoquímico de las mucinas en relación con la edad, la dieta y estados fisiológicos y patológicos (Beyaz y Liman, 2009; Liquori et al., 2012; Mastrodonato et al., 2014).

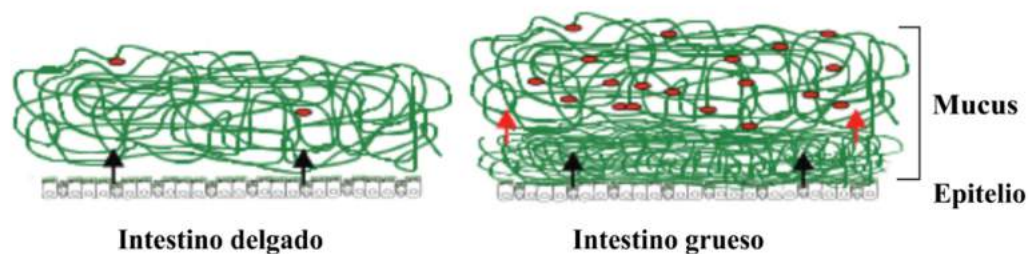


Fig. IV. Esquema que ilustra la organización del mucus en el tracto intestinal. Los puntos rojos representan bacterias y las flechas indican la secreción de mucus (verde) por células caliciformes (Adaptado de Hansson, 2012).

## 5.2 Mucinas: estructura, clasificación y función.

El mucus está compuesto principalmente por agua y mucinas, entre otros componentes menores tales como sales, lípidos, inmunoglobulinas y factores de crecimiento. Las mucinas son glicoproteínas de alto peso molecular (0,5 a 20 MDa) que presentan un elevado contenido de oligosacáridos O-ligados agrupados en repeticiones en tándem de péptidos ricos en treonina, serina y prolina (dominios PTS) y una menor proporción de oligosacáridos N- ligados. En función de su estructura, se pueden clasificar en dos tipos diferentes: a) mucinas secretoras formadoras de geles (ej. MUC2, MUC5AC, MUC6 y MUC19), que son un componente fundamental del mucus y le confieren gran parte de sus propiedades físico-químicas; y b) mucinas transmembrana (ej. MUC1, MUC3A/B, MUC4, MUC12 y MUC13) que se localizan en



la membrana apical de todas las células epiteliales que revisten las mucosas y representan el mayor componente del glicocáliz (Fig. V) (Bansil y Turner, 2006; Johansson et al., 2011a).

El elevado contenido de hidratos de carbono de las mucinas es el principal factor que determina su alto peso molecular y gran parte de sus propiedades físico-químicas. Sus funciones incluyen la lubricación de la mucosa, modulación de la absorción de agua y electrolitos y la protección del epitelio subyacente de la abrasión física y química. Además, se ha demostrado que son el sitio de unión para bacterias comensales y patógenas (Robbe et al., 2004; Kim y Ho, 2010).

La identificación de los diferentes tipos de glicoconjugados (GCs) presentes en secciones de tejido puede realizarse utilizando técnicas histoquímicas para determinar glicanos (Díaz et al., 2010; Zanuzzi et al., 2010). De esta manera, los estudios histológicos e histoquímicos permiten correlacionar las características estructurales de tejidos y órganos con la composición y localización de moléculas específicas (Pellicciari, 2012). Por otro lado, la técnica de lectinhistoquímica provee una importante herramienta para la caracterización *in situ* de GCs, permitiendo detectar residuos de azúcares específicos (Petracioli et al., 2013). Diversos estudios han demostrado que la técnica de lectinhistoquímica es útil también para estudiar los procesos de diferenciación y maduración celular en diferentes linajes celulares (Falk et al., 1994, 1995; Fayed et al., 2010).

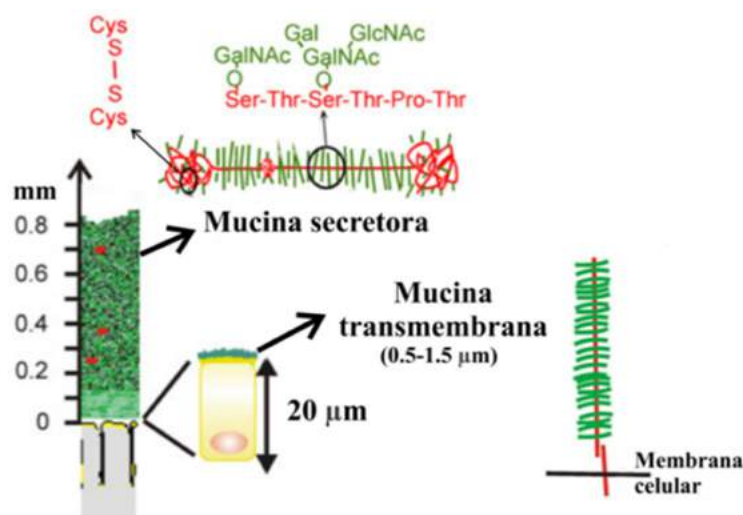


Fig. V. Esquema de las dimensiones y estructuras de las mucinas secretoras (mucus) y transmembrana (glicocáliz) en el intestino grueso de ratón (Adaptado de Johansson et al., 2011a).

### 5.3 Glicocáliz

La segunda línea de defensa del tracto gastrointestinal está constituida por el glicocáliz que está parcialmente integrado con las mucinas del mucus. El glicocáliz representa un conjunto de glicoproteínas y glicolípidos muy diversos anclados en la membrana de las células epiteliales (Chevalier et al., 2017).

En el tracto intestinal se ha estimado que el glicocáliz se extiende hasta 1  $\mu\text{m}$  por encima de la membrana apical de los enterocitos, siendo MUC3, MUC12 y MUC17 las principales mucinas transmembrana que lo conforman (Johansson et al., 2011a). Además de los dominios citosólico y transmembrana, estas mucinas exhiben dominios extracelulares altamente O-glicosilados que, al igual que las mucinas secretoras, forman una barrera estructural que separa el medio luminal del tejido epitelial subyacente. Asimismo, los glicanos terminales presentes en el glicocáliz sirven como receptores y forman el sitio primario para la adhesión bacteriana (Moran et al., 2011). Además, se ha demostrado que los dominios citosólicos de las mucinas MUC3, MUC12 y MUC17 tienen un motivo de unión PDZ en el extremo C-terminal que interactúa con proteínas PDZ citoplásmicas. Estas proteínas actúan como andamios para organizar y clasificar proteínas

transmembrana, especialmente en células polarizadas (Malmberg et al., 2008). Dado que muchas de las proteínas con motivos PDZ C-terminal son canales de iones, se ha sugerido que las mucinas transmembrana que exhiben estos dominios podrían intervenir en el transporte de partículas cargadas eléctricamente.

#### **5.4 Biosíntesis y secreción de mucinas**

En el tracto intestinal, la mucina MUC2 es la principal molécula estructural del mucus (Johansson et al., 2008). En las células caliciformes, los polímeros de MUC2 están densamente empaquetados en vesículas secretoras que se acumulan en la región apical de la célula para luego ser secretados al medio luminal por exocitosis. El primer paso del proceso de polimerización consiste en la formación de dímeros de MUC2 en el retículo endoplasmático mediante uniones disulfuro entre los extremos C terminales de las moléculas. Los dímeros formados pasan al aparato de Golgi donde son altamente O- glicosilados hasta alcanzar una masa molecular de aproximadamente 5 MDa. En la red trans-Golgi los dímeros son almacenados en las vesículas secretorias. El bajo pH y alto contenido de calcio de estos compartimentos induce la formación de trímeros a través de los extremos N-terminales. En este medio, se establecen uniones disulfuro intermoleculares y se forman espontáneamente anillos hexagonales concatenados (Fig. VI). Tras la secreción, las mucinas densamente comprimidas se expanden en un proceso que requiere de un aumento del pH y la eliminación del calcio que se encuentra unido a los extremos N-terminales (Johansson et al., 2011a; Hansson, 2012; Birchenough et al., 2015).

Johansson et al. (2008) han demostrado que en ausencia de esta mucina las bacterias son capaces de establecer contacto directo con las células epiteliales. Tal es así que en ratones mutantes *Muc2*<sup>-/-</sup>, se han identificado bacterias en el fondo de las criptas de Lieberkühn y también dentro de los enterocitos. Estos ratones desarrollan una inflamación del colon generalmente severa con infiltración de neutrófilos y linfocitos, diarrea, prolapsos rectales y falta

de desarrollo. Estos hallazgos demuestran que la mucina Muc2 es indispensable para construir una barrera que separe las bacterias del epitelio intestinal.

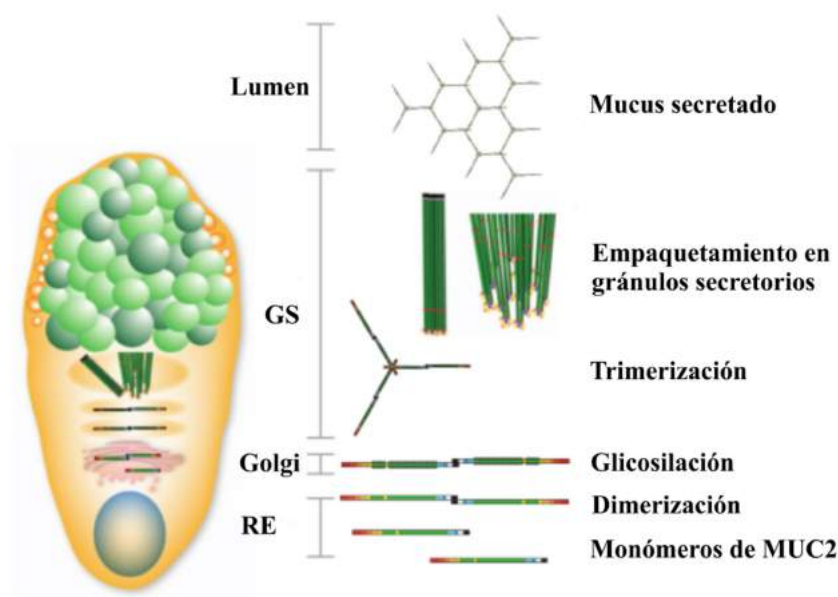


Fig. VI. Síntesis de MUC2 en una célula caliciforme. Representación esquemática de los fenómenos biosintéticos y de los orgánulos que participan en la síntesis de MUC2. GS, gránulos secretorios; RE, retículo endoplasmático (Tomado de Birchenough et al., 2015).

## 6. MOTILIDAD INTESTINAL

El procesamiento de los alimentos que ocurre a lo largo del tubo digestivo depende de funciones motoras, secretoras, digestivas y absortivas. La coordinación de estas actividades está a cargo del sistema nervioso vegetativo y de las hormonas gastrointestinales.

En el tubo digestivo, el sistema nervioso vegetativo tiene un componente extrínseco conformado por los sistemas simpático y parasimpático, y un componente intrínseco que recibe el nombre de sistema nervioso entérico. El sistema nervioso entérico está formado por dos redes neuronales situadas en la pared del tubo digestivo que se denominan plexo submucoso y plexo mientérico. Las neuronas de este componente intrínseco reciben información del parasimpático y del simpático y de mecanorreceptores y quimiorreceptores de la mucosa y envían información a las células musculares lisas, secretoras y endocrinas del tubo digestivo. Por lo tanto, la actividad

motora de la pared depende de la estrecha relación existente entre las neuronas entéricas y las células musculares lisas de la túnica muscular. A partir de los estudios desarrollados en las últimas décadas, se ha determinado que las células intersticiales de Cajal (ICC) forman parte del aparato motor gastrointestinal por su estrecha relación anatómica con las células musculares lisas y las varicosidades nerviosas del sistema nervioso entérico (Fig. VII) (Sanders et al., 2006; Galotta, 2010; Márquez, 2010).

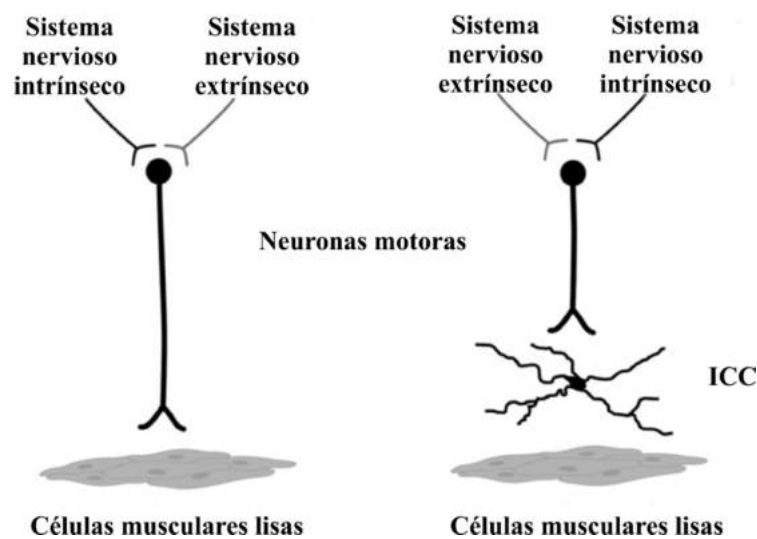


Fig. VII. Innervación de células musculares lisas en el tracto gastrointestinal. Si bien las neuronas pueden innervar directamente las células musculares lisas, la mayoría de las innervaciones ocurre a través de las células intersticiales de Cajal (ICC) (Tomado de Mazzone et al., 2007)

## 7. CÉLULAS INTERSTICIALES DE CAJAL (ICC)

### 7.1 Origen embriológico

Las investigaciones sobre el origen de las ICC y la regulación de su desarrollo han dado lugar a numerosas controversias. Santiago Ramón y Cajal (1911) las consideró un tipo de neurona primitiva por su afinidad tintorial con azul de metileno y sales de plata, y en consecuencia, las denominó “neuronas intersticiales” o “neuronas simpáticas intersticiales”. Por otro lado, a diferencia de Cajal, algunos investigadores sostenían que las ICC eran células musculares lisas especializadas, mientras que otros las consideraban fibroblastos (Sanders et al., 1999).

El análisis ultraestructural de las ICC permitió establecer que carecen de vesículas sinápticas por lo que se descartó que fueran un tipo especializado de neurona (Richardson, 1958). Estos estudios de microscopía electrónica de transmisión aportaron nuevos datos sobre la ultraestructura de las ICC y la estrecha relación que mantienen con los plexos del sistema nervioso entérico. También, permitieron realizar una primera clasificación de las ICC en subpoblaciones en función de su ubicación y morfología (Thuneberg, 1982).

En 1992 se logró el avance más importante en el área al descubrir que la expresión del proto-oncogen c-kit es necesaria para el desarrollo de las ICC en el tracto intestinal (Maeda et al., 1992). Este descubrimiento permitió años más tarde resolver la controversia sobre el origen embriológico de las ICC mediante experimentos de rastreo utilizando el modelo pollo/codorniz (Lecoin et al., 1996). A partir de este estudio, Lecoin et al. (1996) demostraron que las ICC son de origen mesodérmico y que se desarrollan independientemente de las neuronas entéricas con las que luego establecen relaciones anatómicas y funcionales.

Estudios posteriores de hibridación *in situ*, determinaron que las ICC y las células musculares lisas de la capa longitudinal se desarrollan a partir de un precursor mesenquimático común. De esta manera, se demostró que la expresión del proto-oncogen c-kit es necesaria para mantener el fenotipo ICC, dado que cuando la vía kit es bloqueada, las ICC se rediferencian en células musculares lisas. Por otro lado, Sohal et al. (2002) demostraron que en embriones de pollo las ICC del estómago y duodeno se desarrollan a partir de una segunda fuente de células precursoras denominadas células migratorias del tubo neural.

## **7.2 Criterios actuales para la identificación de ICC**

En 1997, Huizinga y colaboradores determinaron un conjunto de criterios que deben cumplir las ICC para poder ser diferenciadas de otras células mesenquimáticas al MET. Estas características ultraestructurales, en conjunto constituyen el criterio “Gold Standard de las ICC”, e incluyen: (1) mitocondrias grandes y a menudo fusiformes; (2) haces de filamentos

intermedios; (3) ausencia de filamentos gruesos; (4) caveolas en la membrana celular; (5) lámina basal discontinua; (6) contactos con haces nerviosos; (7) retículo endoplasmático liso bien desarrollado y cisternas de retículo endoplásmico rugoso no dilatadas; y (8) uniones nexos con células musculares lisas. Además, Popescu et al. (2005) propusieron un criterio adicional a considerar para la identificación de las ICC que consiste en el análisis morfométrico de sus prolongaciones citoplasmáticas, siendo este criterio necesario principalmente para la caracterización de ICC fuera del tracto gastrointestinal.

Además de estos parámetros ultraestructurales, en la actualidad, para considerar a una célula como ICC se requiere de la expresión del receptor c-kit (CD117), siendo este el marcador de elección para identificarlas. Kit es una glicoproteína integral de membrana, producto de la expresión del proto-oncogen c-kit, que pertenece a la subfamilia III de los receptores tirosina-cinasa. Esta subfamilia se caracteriza por presentar un dominio extracelular que consta de cinco motivos de tipo inmunoglobulina (Ig), un dominio transmembrana, un dominio yuxtamembrana y un dominio tirosina-cinasa citosólico interrumpido por una secuencia de aminoácidos hidrófobos (Fig. VIIIA).

El ligando de c-kit es el factor de crecimiento de células madre (SCF, por sus siglas en inglés). El SCF es una proteína transmembrana altamente glicosilada producida por fibroblastos y células endoteliales. La forma biológicamente activa de SCF es un dímero asociado no covalentemente.

La unión de SCF al dominio extracelular de c-kit induce la dimerización del receptor y la posterior activación de la tirosin-cinasa intrínseca del dominio citosólico. La unión al ligando también genera un cambio conformacional en el receptor dando lugar a interacciones receptor-receptor, principalmente en el motivo 4 de tipo Ig, que estabilizan adicionalmente el complejo dimérico. La activación de la cinasa cataliza la trans-fosforilación de los residuos tirosina del dominio catalítico de ambos receptores y promueve una serie de fosforilaciones en cascada que

activan diferentes rutas de señalización intracelular que controlan entre otras funciones la proliferación, apoptosis y adhesión celular (Fig. VIIIB).

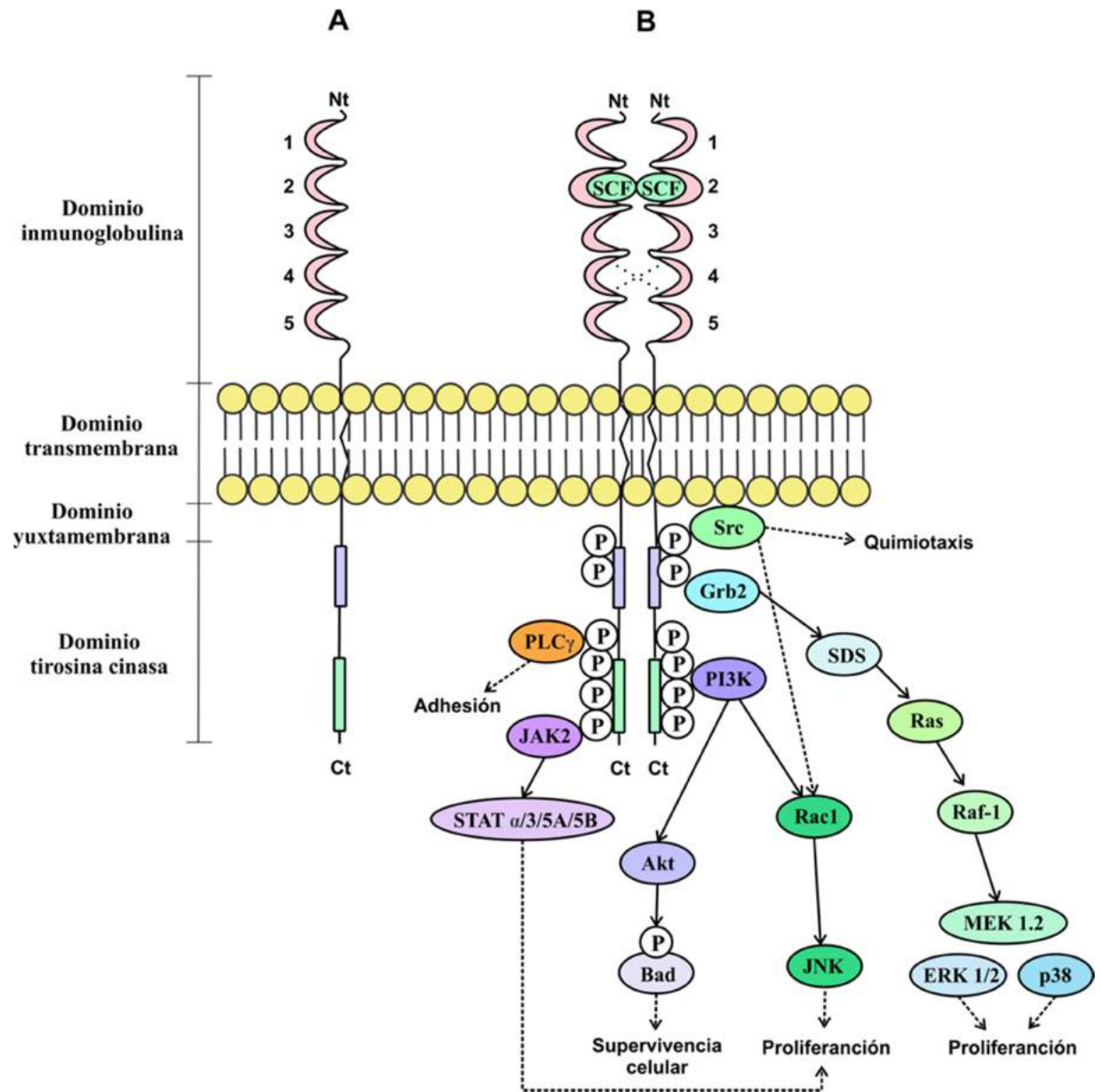


Fig. VIII. Ilustración esquemática del receptor c-kit. (A) Estructura de c-kit. (B) Vía de señalización kit. La unión del ligando SCF induce la homodimerización y autofosforilación del receptor y posterior activación de diferentes vías de señalización. Ct, extremo carboxilo-terminal; Nt, extremo amino-terminal; SCF, factor de células madre (Adaptado de Reber et al., 2006).



### **7.3 Clasificación y patrón de distribución en el TGI**

Las ICC han sido descritas en diferentes especies de mamíferos, siendo el humano la especie en la que se han realizado mayor número de estudios. A partir de estas investigaciones, las ICC han sido identificadas en todos los órganos del tubo digestivo, desde el esófago hasta la región del esfínter interno del ano (Torihashi et al., 1999; Komuro, 2006). En estos estudios se ha demostrado que las características morfológicas y patrones de distribución de las ICC varían dependiendo de sus localizaciones anatómicas, razón por la cual se las ha clasificado en diferentes subtipos (Hanani et al., 2005). En la actualidad, esta clasificación se basa únicamente en la localización de las ICC dentro de la pared del tubo digestivo y hasta el momento ha podido ser aplicada a todas las especies estudiadas.

#### **7.3.1 ICC del plexo mientérico (ICC-MP)**

Las ICC-MP se localizan en el espacio intermuscular entre las capas musculares circular y longitudinal del estómago, intestino delgado y grueso (Sanders et al., 1999). En general, son células multipolares con tres a cinco procesos citoplasmáticos primarios delgados que proyectan ramificaciones secundarias y terciarias (Komuro, 2006). El análisis de la distribución espacial de estas células por microscopía confocal ha demostrado que forman una red celular alrededor del plexo mientérico, rodeando a cada célula ganglionar y acompañando a las fibras nerviosas del plexo primario (Hanani et al., 2005).

#### **7.3.2 ICC intramusculares (ICC-CM e ICC-LM)**

Las ICC intramusculares se localizan entre las células musculares lisas de la túnica muscular y se clasifican en ICC-CM e ICC-LM según se encuentren en la capa circular interna o longitudinal externa, respectivamente. Se caracterizan por ser bipolares con procesos poco ramificados y se orientan según la dirección del eje mayor de las fibras musculares.

En algunas especies, también se han encontrado ICC en los septos de tejido conectivo que separan los fascículos musculares. Algunos autores han denominado a estas células como ICC septales (ICC-SEP), sin embargo actualmente se las considera ICC-CM (Mitsui y Komuro, 2003; Hanani et al., 2005).

### **7.3.3 ICC del plexo muscular profundo (ICC-DMP)**

En el intestino delgado, la capa circular de la túnica muscular se diferencia en dos subcapas, una más gruesa superficial y otra profunda más delgada. Entre ambas capas se localiza un plexo aganglionar compuesto por fibras nerviosas, denominado plexo muscular profundo (DMP, por sus siglas en inglés). Las ICC-DMP están estrechamente asociadas con los haces nerviosos del plexo muscular profundo del intestino delgado. Las ICC-DMP son multipolares pero, a diferencia de las ICC-CM, la mayoría de sus procesos presentan una orientación unidireccional (Komuro, 2006).

### **7.3.4 ICC del borde submucoso (ICC-SM e ICC-SMP)**

Las ICC-SM e ICC-SMP forman una red celular laxa en la interfase entre el tejido conectivo de la submucosa y la capa muscular circular más interna de la región pilórica del estómago y del colon, respectivamente (Ishikawa y Komuro, 1996; Mitsui y Komuro, 2003). Sus ejes celulares son paralelos a los de las células musculares adyacentes y en general contienen pocos procesos secundarios. Además, estudios de microscopía electrónica han demostrado que ambos tipos de ICC mantienen una relación estrecha con fibras nerviosas y establecen uniones nexó entre sí y con células musculares lisas (Ishikawa y Komuro, 1996).

### **7.3.5 ICC de la subserosa (ICC-SS)**

Las ICC-SS exhiben una morfología multipolar y se localizan dentro de la delgada capa de tejido conjuntivo que se encuentra inmediatamente debajo del mesotelio. En algunas especies de

roedores, las observaciones ultraestructurales revelaron que las ICC-SS se conectan entre sí a través de uniones nexo y también forman estrechos contactos con células musculares lisas (Vanderwinden et al., 2000; Aranishi et al., 2009).

## **7.4 Funciones**

En los últimos años, la inmunomarcación anti c-kit, la manipulación de la vía kit y el uso de animales mutantes con función c-kit anormal han permitido evaluar el rol funcional de las ICC. A partir de estas investigaciones se ha podido determinar que las ICC son actores claves en el control de la motilidad gastrointestinal (Ward et al., 2006; Sanders et al., 2012; Al-Shboul, 2013).

### **7.4.1 Las ICC generan y propagan las ondas lentas**

El tejido muscular liso de la pared del tubo digestivo es miogénico, es decir, capaz de producir un ciclo intrínseco de actividad eléctrica que conduce a la contracción muscular sin estimulación nerviosa externa. Este ciclo tiene lugar bajo la forma de despolarizaciones y repolarizaciones rítmicas denominadas ondas lentas. Las ondas lentas son oscilaciones del potencial de membrana que están presentes aún en ausencia de actividad motora y son responsables de la actividad eléctrica espontánea del músculo liso del tubo digestivo. Algunas de estas ondas lentas dan lugar a potenciales de acción producidos por una corriente de entrada generada por un flujo de iones  $\text{Ca}^{2+}$ . Estas espigas de  $\text{Ca}^{2+}$  provocan la contracción de las células musculares lisas en las que se presentan. Las ondas lentas han sido registradas en muchas especies de animales mediante electrodos intracelulares colocados en distintos segmentos gastrointestinales (Sanders, 1992, 2016) y recibieron distintas denominaciones, como ritmo eléctrico básico, potencial de marcapaso o actividad de control eléctrico.

Existen evidencias que indican que las ondas lentas se originan en las ICC. En los primeros estudios se utilizaron tiras musculares intactas incubadas con anticuerpo neutralizante para el receptor tirosina-cinasa, c-kit, durante 31-51 días. Como resultado de este procedimiento, se vieron afectados todos los subtipos de ICC y no se registraron ondas lentas en las células musculares lisas (Ördög et al., 1999). En investigaciones posteriores se registraron ondas lentas en ICC aisladas, lo que finalmente confirmó de forma directa que las ICC actúan como células marcapaso (Koh et al., 1998). El hallazgo de ratones con una mutación que afecta de manera diferencial a las distintas subpoblaciones de ICC permitió determinar que las ICC-MP son el subtipo responsable de actuar como células marcapasos. Las ondas lentas generadas por las ICC-MP se propagan rápidamente a las células musculares lisas de la túnica muscular (Al-Shboul, 2013).

#### **7.4.2 Las ICC actúan como intermediarios de la neurotransmisión**

Estudios anatómicos han demostrado que las ICC forman uniones nexó con las células musculares vecinas y establecen relaciones estrechas con las varicosidades nerviosas (Wang et al., 1999). En base a estas observaciones se ha sugerido que las ICC actúan como intermediarios en la neurotransmisión entre las neuronas entéricas y las células musculares lisas.

Estudios fisiológicos han demostrado que la innervación inhibitoria de los músculos gastrointestinales se concentra en regiones donde se localizan las ICC (Smith et al., 1989; Berezin et al., 1990; Huizinga et al., 1990) y, que las ICC aisladas responden a una variedad de neurotransmisores incluyendo al óxido nítrico y la sustancia P (Publicover et al., 1993).

Mediante microscopía electrónica de transmisión se identificaron abundantes contactos cercanos (<25 nm) entre las terminales nerviosas y la ICC, lo que apoya la existencia de un tipo especializado de transmisión de información neuronal entre los nervios entéricos y la ICC (Wang et al., 1999; Ward y Sanders, 2001; Beckett et al., 2005).

Los animales *knock-out* disponibles para c-kit han sido particularmente útiles para definir el papel de las ICC en la neurotransmisión (Burns et al., 1996; Klein et al., 2013). De esta manera, ha sido posible asociar la falta de ICC-IM en ratones mutantes con la pérdida de respuestas inhibitorias dependientes de óxido nítrico y de respuestas excitatorias colinérgicas (Ward et al., 1998, 2000). Estas observaciones sugieren que las ICC-CM son una pieza fundamental en la neurotransmisión inhibitoria y excitatoria entérica.

#### **7.4.3 Las ICC actúan como mecanosensores**

La hipótesis de que las ICC podrían actuar como sensores de estiramiento se ha propuesto en varias investigaciones, basándose en la existencia de uniones especiales denominadas PSJ (“peg and socket junctions”) entre células musculares lisas y entre células musculares lisas y las ICC (Mazet, 2015).

Sin embargo, la evidencia fisiológica más sólida que apoya el rol de las ICC como mecanosensores se obtuvo aplicando fuerzas para incrementar la longitud de músculos antrales murinos, simulando la distensión de la pared gástrica, mientras se registraba la actividad eléctrica intracelular y la fuerza isométrica (Won et al., 2005). El aumento de la longitud causó la despolarización de la membrana de las células musculares lisas y un incremento en la frecuencia de las ondas lentas. En cambio, el estiramiento de los músculos antrales de ratones mutantes  $W/W^V$ , que carecen de ICC-CM, no generó ninguna respuesta de despolarización. Así, se ha determinado que las respuestas al estiramiento muscular están mediadas por este subtipo de ICC.

### **8. ESPECIALIZACIONES DEL TUBO DIGESTIVO A LA HERBIVORÍA**

Los herbívoros dependen de la fermentación microbiana para poder utilizar la celulosa, componente estructural de todas las plantas, como principal fuente de energía. Los microorganismos simbióticos, bacterias y protozoos, que se encuentran en el tubo digestivo del

hospedador vertebrado producen enzimas para descomponer la celulosa de las plantas ingeridas. Este proceso de degradación genera ácidos orgánicos que son absorbidos y utilizados en el metabolismo oxidativo (Kardong, 2007).

En muchos vertebrados herbívoros, algunas partes del tubo digestivo están especializadas como cámaras de fermentación en las que los microorganismos simbióticos finalmente digieren la celulosa (Randall et al., 1998). Debido a que la fermentación microbiana es relativamente lenta y la celulosa un hidrato de carbono resistente a la degradación, estas cámaras son con frecuencia bastante grandes y largas. Cuando la digestión de la celulosa se produce en un estómago especializado se denomina fermentación gástrica, mientras que la digestión microbiana centrada en el intestino recibe el nombre de fermentación intestinal (Kardong, 2007).

Además de estos cambios estructurales del tubo digestivo, algunos herbívoros han desarrollado adaptaciones morfológicas y fisiológicas que facilitan la retención de los microorganismos en las cámaras de fermentación sin que, al mismo tiempo, se vea afectada la eliminación de las heces. Estos animales utilizan parte de los microorganismos acumulados en las cámaras de fermentación como potencial fuente de aminoácidos mediante un proceso conocido como cecotrofia (Bergen, 2015).

La cecotrofia es un mecanismo fisiológico que ha sido descrito en diferentes especies de pequeños herbívoros y consiste en la ingesta de una cierta fracción de las propias heces (Björnhag y Snipes, 1999; Sakaguchi, 2003). Diversos estudios han demostrado que las heces ingeridas presentan un mayor contenido de proteínas, vitaminas y bacterias, y una menor proporción de fibras que aquellas heces que no son deglutidas (Takahashi y Sakaguchi, 1998; 2000). La formación de dos tipos de heces: uno con alto contenido proteico (heces blandas o cecótrofos) y otro rico en fibras (heces duras) es posible en diferentes especies de mamíferos herbívoros debido al funcionamiento de un mecanismo de separación colónica (MSC). Aunque la identificación de dos tipos de heces es evidente en lagomorfos (conejos y liebres), también se

ha demostrado la formación de cecótrofos en roedores caviomorfos (Takahashi y Sakaguchi, 1998, 2000; Mess y Ade, 2005; Martino et al., 2007). A diferencia de los lagomorfos que presentan un MSC 'dependiente de partículas', la mayoría de los roedores poseen un MSC 'dependiente de mucus' que retiene bacterias en el surco colónico por acción del mucus y las transporta hacia el ciego mediante movimientos antiperistálticos (Takahashi y Sakaguchi, 2000; Kotzé et al., 2009). Como resultado del MSC, las bacterias no se pierden con las heces sino que son acumuladas en el ciego, donde se realiza la fermentación bacteriana. El material que es separado por el MSC es excretado, producto de la contracción del ciego, y re ingerido por el animal.

En general, el principal método utilizado para demostrar cecotrofia es la observación directa de ciertas posturas y movimientos que son característicos de este tipo de comportamiento, como así también el análisis diferencial de heces blandas y duras. Sin embargo, resulta muy difícil observar esta conducta en algunas especies de roedores silvestres que presentan hábitos fosoriales y nocturnos, como es el caso de la vizcachita de llanura, (*Lagostomus maximus*; Desmarest, 1817) (Clauss et al., 2007). En los últimos años, se ha demostrado mediante el uso de marcadores para ensayos de digestibilidad que *L. maximus*, al igual que otros roedores histricomorfos, presenta un surco colónico longitudinal y re ingiere parte de sus propias heces. Además, estudios recientes basados en el pasaje de la ingesta han demostrado en esta especie la existencia de un MSC 'dependiente de mucus' (Clauss et al., 2007; Hagen et al., 2015). La información disponible sobre la fisiología digestiva de *L. maximus* convierte a este roedor en un interesante modelo para el estudio de esta adaptación morfológica a la herbivoría.

A pesar de que se ha sugerido que el mucus posee un rol clave en el transporte de las bacterias a través del surco colónico longitudinal, son escasos los estudios que han determinado las características histoquímicas de las mucinas presentes en esta región, y en particular, no existen

estudios exhaustivos sobre el perfil histoquímico del surco colónico de roedores (Snipes et al., 1988; Kotzé et al., 2009).

## 9. ROEDORES CAVIOMORFOS

Los roedores constituyen el orden más numeroso y diverso de los mamíferos, incluyendo más de 2000 especies actuales. Dentro del orden Rodentia, los caviomorfos (Hystricognatos sudamericanos) conforman un grupo altamente diversificado en relación a sus modos de vida, hábitos locomotores y tamaños corporales (Elissamburu y Vizcaíno, 2004). Esta diversidad es probablemente el resultado de su capacidad para responder a los desafíos ambientales con diferentes adaptaciones morfológicas, fisiológicas y conductuales, que han dado lugar a la ocupación de diversos nichos ecológicos (Vassallo y Antenucci, 2015).

La vizcacha de llanura (*Lagostomus maximus*) es un roedor Hystricognathi (Rodentia, Caviomorpha), de la familia Chinchillidae que habita en Argentina, Bolivia y Paraguay (Fig. IX). En Argentina su distribución se extiende desde el norte del país hasta Río Negro, llegando a habitar regiones situadas a una altitud superior a los 1600 metros sobre el nivel del mar. Se han reconocido tres subespecies: *L.m. inmolis*, *L. m. maximus*, *L. m. petilidens*, todas comunes en sabanas, montes y zonas áridas arbustivas (Llanos y Crespo, 1952; Jackson et al., 1996; Álvarez y Martínez, 2006).

La vida de las vizcachas está íntimamente ligada a las vizcacheras, cuevas de 10 a 20 m<sup>2</sup>, que normalmente están habitadas por entre 4 a 10 individuos emparentados. Las familias están constituidas por un macho dominante, una o varias hembras y sus crías. Las vizcachas tienen hábitos fosoriales y durante la noche salen de sus cuevas para alimentarse de la vegetación circundante. Son roedores exclusivamente herbívoros y en su medio natural se alimentan de una gran variedad de especies vegetales, mostrando preferencia por gramíneas y dicotiledóneas (Puig et al., 1998; Bontti et al., 1999). No acostumbran acarrear alimentos al interior de su cueva, ni



almacenarlos en ella. Se alimentan durante el crepúsculo, momento en que se las observa formando grupos de hasta 30 animales. Generalmente, comienzan a comer cerca de sus cuevas y se van alejando a medida que el alimento escasea en el lugar o cuando existen cultivos a los alrededores. El intenso pastoreo que realizan en esta área afecta a las comunidades vegetales, produciendo un reemplazo de especies y un incremento del suelo desnudo en el área de mayor actividad (Puig et al., 1998; Branch et al., 1999; Arias, 2000). También afectan las propiedades físicas y químicas del suelo por la remoción, el pisoteo y el acopio de materiales en las bocas de las cuevas (Arias, 2000; Villarreal et al., 2008).

Es un animal gregario por excelencia; tiene una estructura social compleja y una vocalización muy rica, en cuanto a variedad de sonidos y modulaciones guturales, que posibilita una comunicación permanente entre los animales de distintas vizcacheras (Branch, 1993).

Entre los predadores naturales de *L. maximus* se encuentran los zorros (*Cerdocyon thous entrerianus* y *Pseudolopex gymnocercus*) y la boa de las vizcacheras (*Constrictor constrictor occidentalis*) (Llanos y Crespo, 1952; Jackson et al., 1996). Estas tres especies han disminuido notablemente en los últimos años, por lo cual en la actualidad el control de la población de vizcachas lo ejerce principalmente el hombre, quien las captura en forma indiscriminada, ya sea por los perjuicios que ocasionan en el campo o para utilizar principalmente su carne como recurso alimenticio (Branch et al., 1999; Arias et al., 2003).

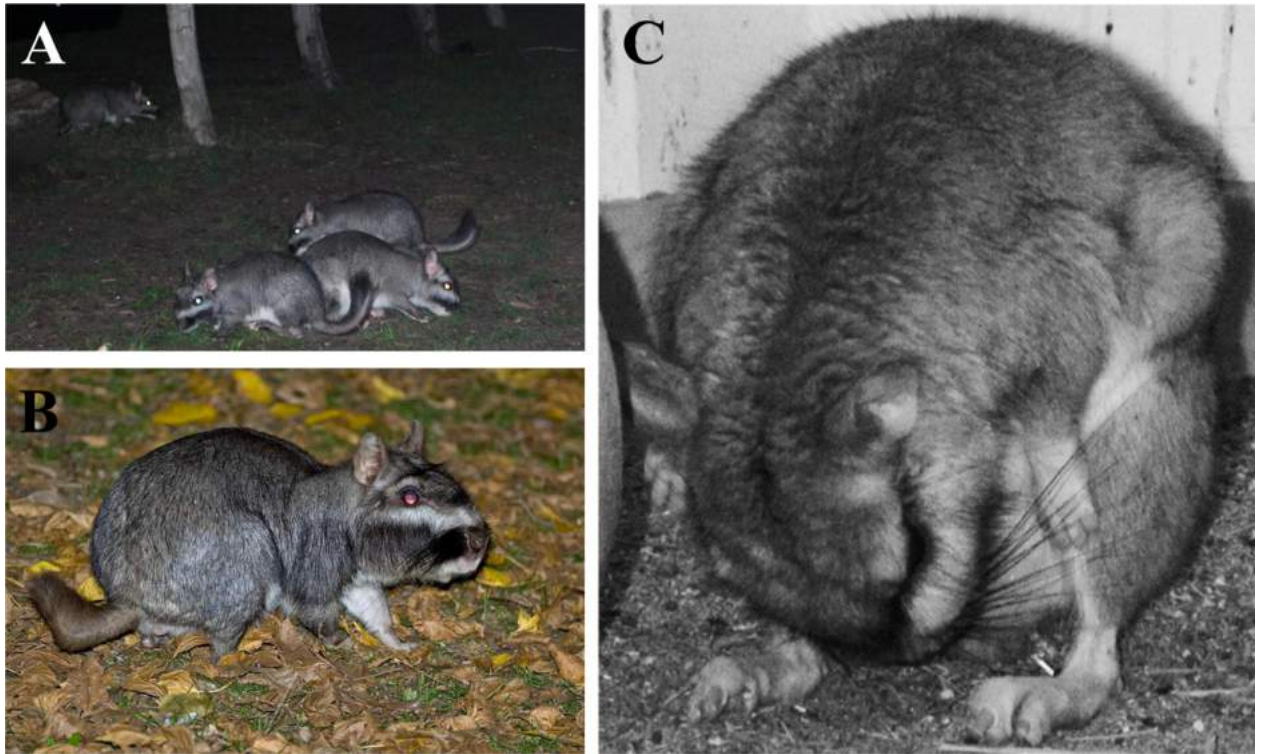


Fig. IX. Imágenes de vizcachas de llanura (*Lagostomus maximus*). (A) Grupo de vizcachas en el Parque Nacional El Palmar, Entre Ríos. (B) Vista lateral de una vizcacha adulta, Parque Nacional El Palmar, Entre Ríos (<http://www.ecoregistros.org/site>). (C) Comportamiento postural indicativo de coprofagia observado esporádicamente en *L. maximus* (Tomada de Hagen et al., 2015).

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

---

En Argentina, la vizcacha de llanura (*Lagostomus maximus*) ha sido declarada plaga nacional por ser considerado un animal perjudicial para la agricultura, las industrias derivadas del agro y la ganadería (Llanos y Crespo, 1952; Jackson et al., 1996; Villarreal et al., 2008). Debido a su importancia zootécnica, se ha propuesto el uso sustentable de esta especie como alternativa para resolver conflictos en el manejo de las poblaciones de vizcacha (Navarro et al., 1997). Al respecto, existen en nuestro país valiosos antecedentes de actividades ligadas con la explotación de *L. maximus* (Jackson et al., 1996; Navarro et al., 1997). Para promover el aprovechamiento sostenido de la fauna silvestre argentina resulta necesario ampliar el conocimiento de la biología básica de esta especie, aportando bases morfológicas para el análisis histofisiológico y anatómo-patológico. En este sentido, se ha sugerido la incorporación de roedores histricomorfos, tanto africanos como sudamericanos, en programas internacionales de desarrollo económico y en investigaciones básicas y aplicadas (National Research Council, 2000).

El potencial interés comercial en *L. maximus* ha llevado a que en los últimos años se realizaran diversos estudios en el ovario, vagina y placenta (Jensen et al. 2006, 2008; Gil et al. 2007; Flamini et al., 2009, 2011, 2012), el epidídimo (Cruceño et al., 2017) y algunas glándulas endocrinas y órganos de los sentidos (Romera et al., 2005, 2010; Filippa y Mohamed, 2010). Aunque las investigaciones relacionadas con el estudio del sistema digestivo son relevantes por su potencial transferencia a ensayos experimentales sobre dieta, al presente son escasos los estudios integrativos de las características morfológicas y fisiológicas del aparato digestivo de *L. maximus* (Clauss et al., 2007; Hagen et al., 2015).

Las hipótesis de trabajo propuestas para el presente trabajo de tesis son las siguientes:

“El patrón de glicosilación del tracto intestinal de *L. maximus* evidencia un alto nivel de complejidad histoquímica, que varía según el segmento intestinal y el tipo celular estudiado”.

“Las ICC se hallan en la especie a analizar, en un patrón semejante al encontrado en otros mamíferos, aunque con ciertas diferencias que dependen del desarrollo de la capa muscular del tubo intestinal”.

“Existe una relación entre la distribución de las ICC y la localización de los diversos procesos motores que ocurren en el tracto intestinal de *L. maximus*”.

Para poner a prueba las hipótesis anteriores, el objetivo general del presente plan de trabajo se centró en estudiar las características morfológicas e histoquímicas del tracto intestinal de la vizcacha de llanura (*Lagostomus maximus*).

Los objetivos particulares comprenden:

- a. Describir las características histológicas del tracto intestinal de *L. maximus* y caracterizar ultraestructuralmente los distintos tipos celulares del epitelio.
- b. Analizar el patrón de glicosilación del intestino delgado y grueso y establecer relaciones con las funciones de los diferentes tipos celulares analizados.
- c. Demostrar la presencia de células intersticiales de Cajal (ICC) y caracterizar su morfología y patrón de distribución.
- d. Determinar el patrón lectinhistoquímico y las características morfométricas de las ICC en los diferentes segmentos del tracto intestinal.

## MATERIALES Y MÉTODOS

---

### 1. MATERIAL BIOLÓGICO

Se utilizaron vizcachas adultas silvestres de ambos sexos (Desmarest, 1817) (n= 14, 8 hembras y 6 machos), provenientes de la Estación de Cría de Animales Silvestres (ECAS), Ministerio de Agroindustria de la Provincia de Buenos Aires (Argentina).

Las capturas fueron realizadas durante los períodos marzo-abril, julio-agosto y diciembre-enero, entre los años 2009 y 2014. Para ello, se utilizaron jaulas-trampas fabricadas con un armazón de hierro revestido por una malla de alambre artístico. La dimensión de cada jaula-trampa fue de 1x0,35x0,35 m, aproximadamente. Se adaptó la boca de las vizcacheras para lograr que una pequeña parte de la jaula-trampa quede inmóvil dentro de la cueva. Dado que las vizcacheras están formadas por una serie de cuevas individuales conectadas entre sí, las trampas se colocaron en varias bocas de cada cueva y se bloquearon el resto de las entradas. Debido al hábito crepuscular y nocturno de estos roedores, las trampas fueron colocadas durante el mediodía y se retiraron al día siguiente por la mañana. Con este método, fue posible la captura de más de un animal por trampa (Flamini, 2005).

Los animales capturados fueron anestesiados mediante la administración de una dosis de xilacina (8 mg/kg de peso corporal) seguida de ketamina (50 mg/kg de peso corporal) por vía intramuscular (Ketanest, Laboratorio Scott Cassara). Cada animal anestesiado fue pesado y sexado por el método tradicional de distancia ano-genital. Las hembras presentaron un peso corporal que osciló entre 4 a 5,5 kg, mientras que los machos pesaron entre 7 a 8,5 kg. Además, se inspeccionó el aspecto externo de los animales para evaluar su estado sanitario, observando especialmente el estado de la cubierta pilosa y la presencia de ectoparásitos y lesiones tegumentarias. Una vez que alcanzaron el plano profundo de anestesia, se practicó la perfusión por vía intracardíaca con solución salina fisiológica y a continuación con paraformaldehído al 4% en buffer fosfato 0,1 M. Se utilizó este método debido a que la fijación por perfusión a través

del corazón favorece la fijación *in situ* de todos los órganos y permite, entre otras ventajas, un mayor aprovechamiento de cada animal destinado a investigación. Además, el método de perfusión reduce las reacciones inespecíficas debidas a peroxidasas endógenas contenidas en eritrocitos. El método utilizado fue aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Universidad Nacional de La Plata (52-4-15T) y está de acuerdo con las recomendaciones internacionales para el uso de animales de experimentación (Commission on Life Sciences National Research Council, 1996; Zuñiga et al., 2001).

## 2. MUESTREO Y PROCESAMIENTO HISTOLÓGICO

La necropsia se realizó inmediatamente después del sacrificio, aislando el tubo digestivo. Todas las muestras analizadas se tomaron de las mismas regiones anatómicas (Tabla 1).

Para describir las características macroscópicas del surco colónico, se expuso la mucosa interna del colon ascendente realizando un corte a lo largo del lado antimesentérico del órgano. Luego, se tomaron fotografías de toda su longitud para describir la extensión del surco colónico y la forma de sus crestas.

**Tabla 1.** Regiones anatómicas estudiadas en cada uno de los ejemplares.

Órgano	Región estudiada
<b>Intestino delgado</b>	Porción craneal del duodeno
	Tercio medio del yeyuno
	Porción caudal del íleon
<b>Intestino grueso</b>	Cuerpo del Ciego
	Porción craneal del colon ascendente
	Porción craneal del colon descendente
	Región caudal del recto

Las muestras fueron deshidratadas por inmersión en una serie de alcohol etílico de graduación creciente (70°, 96° I, 96° II, 100° I, 100° II) durante una hora por baño. Luego, se sumergieron en dos baños de xilol (dimetilbenceno) de 45 minutos cada uno. La inclusión de las muestras se realizó en parafina 56-58°C. Con los tacos obtenidos se realizaron cortes de 4 µm de espesor con micrótopo de deslizamiento. Los cortes obtenidos fueron desparafinados con xileno y rehidratados mediante el uso de una serie de alcoholes de concentración decreciente. Luego, fueron sometidos a las técnicas que se enumeran a continuación.

## **2.1 TÉCNICAS HISTOLÓGICAS**

**2.1.1 Hematoxilina- eosina (H-E).** Esta tinción colorea todas las estructuras tisulares y, por su buen contraste, proporciona imágenes citológicas bien definidas. Contiene un colorante que tiene afinidad por las estructuras aniónicas de las células y tejidos como el DNA y RNA (hematoxilina-alumbre de hemateína) y otro colorante ácido que reacciona con grupos catiónicos, en particular con el citoplasma de algunos tipos celulares y estructuras extracelulares de carácter básico (eosina).

Esta coloración se utilizó para determinar las características histológicas generales de los distintos órganos estudiados. Los cortes fueron colocados en una solución de hematoxilina de Gill (II) (BIOPUR) durante 35 segundos y posteriormente fueron sumergidos en agua corriente para producir el virado del colorante. Luego, fueron coloreados durante 1 minuto en una solución de eosina amarilla al 1% en agua destilada. Finalmente se procedió a la deshidratación, aclarado y montaje con Entellan (Merck) (Martoja y Martoja-Pierson, 1970; Montuenga Badía et al., 2014).

Como resultado de esta técnica, todas las estructuras aniónicas de las células y tejidos con afinidad por la hematoxilina se observan de color azul violáceo mientras que las estructuras acidófilas se colorean con diferentes tonalidades de rosa.

**2.1.2 Tricrómico de Masson.** Los métodos tricrómicos son coloraciones policrómicas en las que se utilizan al menos tres colorantes que presentan afinidad por diferentes estructuras tisulares, permitiendo la diferenciación entre tejido epitelial, fibras musculares y colágenas.

Esta técnica se utilizó para realizar estudios morfológicos generales y diferenciar tejidos. Los cortes fueron expuestos a una solución de azul celeste durante 5 minutos. Luego, se lavaron en agua destilada y se colorearon en una solución de hematoxilina de Gill (II) durante 1 minuto. Luego del virado en agua corriente, los cortes fueron colocados en una solución de fucsina ácida durante 10 a 15 segundos. A continuación, se lavaron en agua destilada y se diferenciaron durante 5 minutos en ácido fosfomolibdico. Luego, sin enjuagar, se colorearon con azul de anilina durante 10 minutos. Posteriormente fueron diferenciados en ácido acético acuoso al 1% para remover el exceso de azul de anilina. Antes de realizar la deshidratación y el montaje, los cortes fueron lavados en una solución de ácido acético alcohólico al 1% durante 30 segundos.

Como resultado de esta técnica, los núcleos se colorean de azul violáceo por su afinidad con la hematoxilina, el músculo y el citoplasmas se colorean de rojo y las fibras colágenas se identifican por su color azul (Montuenga Badía et al., 2014).

## **2.2 ESTUDIO HISTOQUÍMICO PARA DETERMINACIÓN DE GLICOCONJUGADOS**

Los cortes histológicos también fueron sometidos a las siguientes técnicas histoquímicas para la caracterización de glicoconjugados (GCs) con el fin de evaluar su distribución y posibles roles fisiológicos (Tabla 2):

**2.2.1 Ácido periódico- Reactivo de Schiff (PAS).** Para evidenciar GCs con dioles vecinos oxidables y glucógeno, los cortes fueron tratados con ácido periódico al 1% durante 15 minutos. Luego, se lavaron en agua corriente y se tiñeron durante 2 minutos con el reactivo



de Schiff (Mc Manus, 1948). En esta técnica el ácido periódico rompe la unión entre carbonos con hidroxilos adyacentes y forma grupos aldehído. Esta reacción de oxidación se detiene al abrirse la unión 1,2 entre los átomos de carbono. En un segundo paso, el reactivo de Schiff (parafucsina en ácido sulfuroso) reacciona con los aldehídos para dar un color magenta distintivo.

**2.2.2  $\alpha$ -amilasa-PAS.** Para la identificación de glucógeno los cortes fueron sometidos a una digestión enzimática con  $\alpha$ -amilasa en cámara húmeda a 36°C durante 45 minutos. Luego, se continuó con la técnica de PAS (Pearse, 1985).

**2.2.3 KOH/PA\*S** (saponificación- ácido periódico selectivo- reactivo de Schiff). Esta técnica permite la caracterización de GCs con residuos de ácido siálico. La reacción de saponificación (KOH) se realizó con hidróxido de potasio al 0,5% en etanol 70% durante 30 minutos a temperatura ambiente. Previo al reactivo de Schiff, los cortes fueron sometidos a una oxidación selectiva con ácido periódico 0,4 mM en ácido clorhídrico 1 M a 4°C (Culling et al., 1976).

**2.2.4 PA/Bh/KOH/PAS** (ácido periódico- reducción con borohidruro - saponificación- ácido periódico- reactivo de Schiff). Este método permite demostrar la presencia de GCs con residuos de ácido siálico con O-acil sustituciones en los  $^7\text{C}$ ,  $^8\text{C}$  o  $^9\text{C}$  y O-acil azúcares. En esta técnica los cortes fueron sometidos a una oxidación a temperatura ambiente con ácido periódico al 1% durante 2 h. Los aldehídos generados por la oxidación inicial fueron reducidos a alcoholes primarios con borohidruro de sodio. Luego de la saponificación (KOH) se realizó la técnica de PAS (Reid et al., 1973).

**2.2.5 KOH/PA\*/Bh/PAS** (saponificación- ácido periódico selectivo- reducción con borohidruro- ácido periódico- reactivo de Schiff). Esta técnica permite identificar azúcares neutros. Los cortes fueron tratados con hidróxido de potasio al 0,5% en etanol 70% durante 15 minutos a temperatura ambiente. Previo a la técnica de PAS, se realizó una oxidación

periódica selectiva a 4 °C durante 1 h seguido de una reducción con borohidruro de sodio (Volz et al., 1987).

**2.2.6 Azul Alcian (AB).** El AB es un colorante básico que tiene afinidad por los componentes aniónicos de las células y tejidos, tales como los GCs ácidos. Soluciones de AB a diferentes pH se utilizaron para colorear selectivamente subgrupos de mucinas ácidas. Los GCs con grupos carboxílicos y esteres O-sulfatados se pusieron en evidencia con una solución a pH 2,8, mientras que las sulfomucinas y los GCs altamente sulfatados se identificaron con una solución a pH 1,0 y 0,5, respectivamente (Lev y Spicer, 1964).

**2.2.7 AB/PAS** (Azul Alcian/Ácido Periódico- Reactivo de Schiff). Esta técnica combinada permite identificar GCs ácidos (AB positivos), neutros (PAS positivos) y mixtos (AB/PAS positivos) en un mismo corte. Los cortes fueron sometidos a la técnica de AB seguida por la técnica de PAS. La solución AB se utilizó a pH 2,8 y 1,0 para identificar GCs carboxilados y sulfatados, y GCs con esteres O-sulfatados, respectivamente (Mowry, 1963).

**2.2.8 Azul de Toluidina (AT).** Este colorante básico es un derivado de las tiazinas que tiene afinidad por componentes ácidos de los tejidos. El AT, al igual que la mayoría de los colorantes, es ortocromático es decir que tiñe el tejido con su propio color (azul). Sin embargo, el AT también tiene la capacidad de teñir polímeros polianiónicos de un color diferente al del tinte original del colorante. Este fenómeno recibe el nombre de metacromasia. La metacromasia ocurre porque en presencia de polianiones las moléculas de colorante se aproximan mucho entre ellas, de modo que se produce un cambio en su rango de absorción lumínica.

La solución de AT se utilizó a pH 5,6 y 4,2 para identificar GCs carboxilados y sulfatados, y GCs con esteres O-sulfatados, respectivamente. En ambos casos, si los GCs detectados presentan una alta concentración de grupos aniónicos se teñirán de color rojo-púrpura

(metacromasia); mientras que en ausencia de polianiones se teñirán de color azul (ortocromasia) (Lison, 1953).

**Tabla 2.** Técnicas histoquímicas utilizadas para la identificación de glicoconjugados (GCs)

<b>Técnica<sup>a</sup></b>	<b>Interpretación de la reacción</b>	<b>Color que indica reacción positiva</b>
<b>1. PAS</b>	GCs con dioles vecinos oxidables y glucógeno	Magenta
<b>2. <math>\alpha</math>-amilasa-PAS</b>	GCs con dioles vecinos oxidables	
<b>3. KOH/PA*S</b>	GCs con residuos de ácido siálico	
<b>4. KOH/PA*/Bh/PAS</b>	GCs con dioles vecinos oxidables y O-acil azúcares	
<b>5. PA/Bh/KOH/PAS</b>	Residuos de ácido siálico con sustituciones O-acil en $^7C$ , $^8C$ o $^9C$ y O-acil azúcares	
<b>6. AB pH 2,8</b>	GCs con grupos carboxilos y ésteres O-sulfatados	Turquesa
<b>7. AB pH 1,0</b>	GCs con ésteres O-sulfatados	
<b>8. AB pH 0,5</b>	GCs altamente sulfatados	
<b>9. AB pH 2,8/PAS</b>	GCs ácidos y con grupos dioles vecinos	Turquesa (AB positivo) Magenta (PAS positivo)
<b>10. AB pH 1,0/PAS</b>	GCs sulfatados y con grupos dioles vecinos	Púrpura (AB/PAS positivo)
<b>11. AT pH 5,6</b>	GCs carboxilados y sulfatados	Azul (ortocromasia)
<b>12. AT pH 4,2</b>	GCs sulfatados	Rojo- Púrpura (metacromasia)

<sup>a</sup>AB, Azul Alcian; AT, Azul de Toluidina; Bh, Borohidruro de sodio; GCs, glicoconjugados; PA, Oxidación con ácido periódico; PA\*, Oxidación con ácido periódico selectivo; PAS, ácido periódico/reactivo de Schiff; PA\*S, ácido periódico/Schiff a baja temperatura y bajo pH.

Los resultados fueron evaluados por observadores independientes utilizando una escala semicuantitativa para determinar la intensidad de las reacciones (0, reacción negativa; 1, leve; 2, moderada y 3, fuerte). Esta clasificación fue establecida de acuerdo a estudios histoquímicos previos (Díaz et al., 2010; Scillitani y Mentino, 2015).

### **2.3 ESTUDIO LECTINHISTOQUÍMICO**

Las lectinas son un grupo heterogéneo de proteínas o glicoproteínas, de origen no inmune, que tienen la propiedad de unirse con alta especificidad a residuos de monosacáridos presentes en los GCs. Las lectinas contienen dominio de reconocimiento de carbohidratos (CRD) que poseen la capacidad de unirse en forma reversible a ciertos azúcares mediante interacciones moleculares no covalentes como puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas. Entre las aplicaciones de la técnica lectinhistoquímica se destacan: la posibilidad de caracterizar carbohidratos en cortes de tejidos y la capacidad de determinar con gran sensibilidad y especificidad variaciones en el patrón de glicosilación de las células, lo que permite discriminar distintas poblaciones celulares (Gimeno y Barbeito, 2004).

Se utilizó una batería de siete lectinas biotiniladas (Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA, USA) para la identificación de residuos de azúcares específicos (Tabla 3). Los cortes de parafina fueron montados sobre portaobjetos tratados con poli-L-lisina (Sigma Diagnostics, St Louis, MO, USA), desparafinados con xilol e incubados en una solución 0,3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en metanol, durante 30 minutos a temperatura ambiente, para inhibir la actividad de la peroxidasa endógena. A continuación, los cortes fueron hidratados, lavados con buffer fosfato salino (PBS) 0,01 M pH 7,6 e incubados con una solución de albúmina sérica bovina en PBS durante 20 minutos, para bloquear las uniones inespecíficas. Luego de lavar con PBS, los cortes fueron incubados con cada una de las lectinas biotiniladas, durante 30 minutos a temperatura ambiente, y tratados con el complejo avidina biotina-peroxidasa (ABC) durante 45 minutos (Vector Laboratories, Inc). La peroxidasa se activó por incubación durante 4-10 min con una solución tamponada de Tris-HCl

0,05 M pH 7,6 que contiene 0,02 % de diaminobencidina (DAB) (Dako, Carpinteria, CA, EE.UU.) y 0,05 % de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Todas las lectinas fueron empleadas en una dilución de 30 mg ml<sup>-1</sup> en PBS, excepto PNA que fue aplicada a una concentración de 10 mg ml<sup>-1</sup>.

La evaluación de los resultados fue realizada en forma semicuantitativa, utilizando la misma escala que para el análisis histoquímico. Se realizaron dos tipos de controles: (1) la solución de lectinas fue reemplazada por PBS y (2) las lectinas fueron preincubadas a temperatura ambiente por 1 h en presencia de los azúcares bloqueantes apropiados.

**Tabla 3.** Lectinas utilizadas con sus acrónimos y afinidades.

Lectina	Acrónimo	Afinidad	Azúcares bloqueantes
<b>GRUPO I</b>		Glc/Man	
<i>Canavalia ensiformis</i>	Con-A	$\alpha$ -D-Man; $\alpha$ -D-Glc	$\alpha$ -D-Metilman
<b>GRUPO II</b>		GlcNAc	
<i>Triticum vulgaris</i>	WGA	$\beta$ -D-GlcNAc; NeuNAc	NeuNAc
<b>GRUPO III</b>		GalNAc/Gal	
<i>Dolichos biflorus</i>	DBA	$\alpha$ -D-GalNAc	D-GalNAc
<i>Glycine max</i>	SBA	$\alpha$ -D-GalNAc; $\beta$ -D-GalNAc	D-GalNAc
<i>Recinus communis</i>	RCA-I	$\beta$ -Gal	Lactosa
<i>Arachis hypogaea</i>	PNA	$\beta$ -D-Gal ( $\beta$ 1-3) > D-GalNAc	Lactosa
<b>GRUPO IV</b>		L-Fuc	
<i>Ulex europaeus</i>	UEA-I	$\alpha$ -L-Fuc	L-Fuc

Gal: galactosa; GalNAc: N-acetilgalactosamina; Glc: glucosa; GlcNAc: N-acetilglucosamina; L-Fuc: L-fucosa; Man: manosa;  $\alpha$ -D-Metilman:  $\alpha$ -D-Metilmanosa; NeuNAc: ácido N-acetilneuramínico (ácido siálico)

## **2.4 ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO**

Para el análisis inmunohistoquímico se utilizó el método Envision (Dako Corp., Carpinteria, CA, USA). Se empleó un anticuerpo policlonal de conejo anti-c-kit (CD117) (Dako, Japan A4502) como anticuerpo primario para detectar ICC. Los cortes de parafina fueron montados sobre portaobjetos positivados (Starfrost, Knittel glaser), desparafinados con xilol e incubados en una solución 0,3 %  $H_2O_2$  en metanol durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación fueron hidratados y lavados con PBS 0,01 M pH 7,6. Luego, se aplicó una técnica de recuperación antigénica utilizando un horno microondas a 800w y buffer citrato 0,01 M pH 6,0 a 100°C durante dos ciclos de 3 minutos cada uno. Luego de lavar con PBS, los cortes fueron incubados con una solución de albúmina sérica bovina al 1% durante 30 minutos para bloquear las uniones inespecíficas. Los cortes fueron incubados con el anticuerpo primario (dilución 1:50) durante 1 hora a 25°C, mientras que los controles negativos fueron incubados con PBS bajo las mismas condiciones. Además, se usaron intestinos de gato y bovino positivos a c-kit como controles positivos de la técnica. Luego de la incubación con el polímero conjugado con peroxidasa e inmunoglobulinas anti-conejo (Dako, K1490), se utilizó 3',3'-diaminobencidina (DAB) como cromógeno y 0,05 % de  $H_2O_2$ . Finalmente, los cortes fueron contrastados con hematoxilina (BIOPUR), deshidratados y montados.

## **3. ESTUDIO MORFOMÉTRICO**

Las células analizadas mediante morfometría fueron aquellas positivas a la técnica inmunohistoquímica anti c-kit en la región del plexo mientérico. Además, en el surco colónico longitudinal se analizaron las células c-kit positivas del borde submucoso. Para el análisis morfométrico se utilizaron cinco ejemplares (2 hembras y 3 machos), en los cuales se midió entre siete y quince células inmunomarcadas por región anatómica. Las imágenes fueron capturadas con una magnificación de 40X mediante una cámara digital (Olympus DP71, Tokio,

Japón) montada sobre un microscopio (Olympus BX50, Tokio, Japón) y procesadas con un programa de análisis de imágenes digitales (ImagePro Plus v6.3, Media Cybernetics, Bethesda, MD, EE.UU.). La digitalización de las imágenes se realizó en formato TIFF con una profundidad de píxel de 24 bits. Las imágenes obtenidas presentaron una resolución de 2048 x 1536 pixels que correspondió a una calibración espacial de 0.325  $\mu\text{m}/\text{pixel}$ . Los valores morfométricos determinados fueron: área, eje mayor, eje menor y perímetro. Los valores obtenidos fueron expresados mediante la media  $\pm$  error estándar.

#### **4. ESTUDIO ESTADÍSTICO**

Los resultados fueron analizados mediante el análisis de varianza (ANOVA) y el test de t, seguido del test de Bonferroni para comparaciones simultáneas de pares de datos. Se compararon los valores obtenidos en los distintos sectores del tracto intestinal en la región del plexo mientérico. En el caso particular del surco colónico se analizó la región del borde submucoso. Los valores de  $P < 0.05$  fueron considerados como significativos.

#### **5. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (MET)**

Para realizar un estudio ultraestructural del epitelio intestinal de *L. maximus* se tomaron muestras de 0,5- 1 mm<sup>3</sup> de diferentes segmentos del intestino delgado (duodeno, yeyuno e íleon) y del intestino grueso (ciego, colon ascendente, colon descendente y recto). Las secciones fueron fijadas en una solución de glutaraldehído al 2% en buffer fosfato 0,1 M (pH 7,3) a una temperatura de 4°C durante 2 h. Posteriormente las muestras fueron sometidas a tres lavados sucesivos, en buffer fosfato salino 0,1 M (PBS) a pH 7,2, cada uno de 20 minutos. Se postfijaron en tetróxido de osmio al 1% a 4°C durante 1 h, se deshidrataron en soluciones de etanol de concentración creciente y se incluyeron en Epon 812. Para realizar un estudio preliminar del material al microscopio óptico se realizaron cortes semifinos que fueron coloreados con azul de

toluidina. Luego, se realizaron cortes ultrafinos que fueron contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo al 1%. Las muestras fueron examinadas con un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM 1200EX II del Servicio Central de Microscopia Electrónica “Dr. Shin-Ichi Itagaki”, FCV, UNLP y fotografiadas con una cámara digital (ES 500W Erlangshen Gatan CCD).



## RESULTADOS

---

### 1. INTESTINO DELGADO

#### 1.1 Características morfológicas generales

El intestino delgado de *L. maximus* presentó la organización estructural básica del tubo digestivo. En toda su extensión se identificaron, desde la superficie luminal hacia el exterior, las siguiente túnicas: mucosa, submucosa, muscular y serosa (Fig. 1A).

La túnica mucosa presentó vellosidades tapizadas por un epitelio cilíndrico simple formado principalmente por enterocitos (Fig. 1B). Estas células absortivas presentaron un núcleo ovoide de disposición basal y un citoplasma eosinófilo. Su superficie apical exhibió un borde refringente que se corresponde con la chapa estriada (Fig. 1B). Entre los enterocitos se identificaron abundantes células caliciformes y algunas células enteroendocrinas con gránulos de localización basal (Figs. 1B, 4d). Las células de Paneth se localizaron en la base de las criptas de Lieberkühn de los tres segmentos intestinales, aunque predominaron en el yeyuno. Estas células presentaron una forma piramidal y numerosos gránulos acidófilos en su citoplasma apical (Fig. 2A, C). Subyacente al epitelio se observó una lámina propia muy desarrollada de tejido conjuntivo laxo en la que pudieron observarse células del sistema inmunitario, entre ellas linfocitos, plasmocitos y mastocitos (Fig. 1B-D). En el yeyuno se identificaron linfonódulos dispersos individualmente en la lámina propia, mientras que el borde antimesentérico del íleon presentó placas de Peyer. La muscular de la mucosa se caracterizó por ser muy delgada y discontinua en los tres segmentos intestinales (Fig. 1C, D).

La túnica submucosa de tejido conjuntivo denso presentó vasos sanguíneos de gran calibre y componentes del plexo de Meissner. Una característica conspicua del duodeno fue la existencia de glándulas submucosas túbulo alveolares ramificadas, también conocidas como glándulas de Brunner (Fig. 1A). La distribución de estas glándulas submucosas no se encontró limitada únicamente a la submucosa, sino que también se observaron en la región más profunda de la

lámina propia (Fig. 1C). Las glándulas de Brunner exhibieron adenómeros formados por células mucosas y conductos excretores que desembocan en la luz intestinal.

La túnica muscular presentó dos capas concéntricas de músculo liso relativamente gruesas, entre las cuales se ubican las células ganglionares y fibras nerviosas del plexo de Auerbach (Figs. 1E y 2B, D). Este plexo se visualizó en toda la extensión del intestino delgado y exhibió un gran desarrollo (Fig. 2B, D). La serosa consistió en tejido conjuntivo laxo y un epitelio simple plano (mesotelio) (Fig. 2B, D).

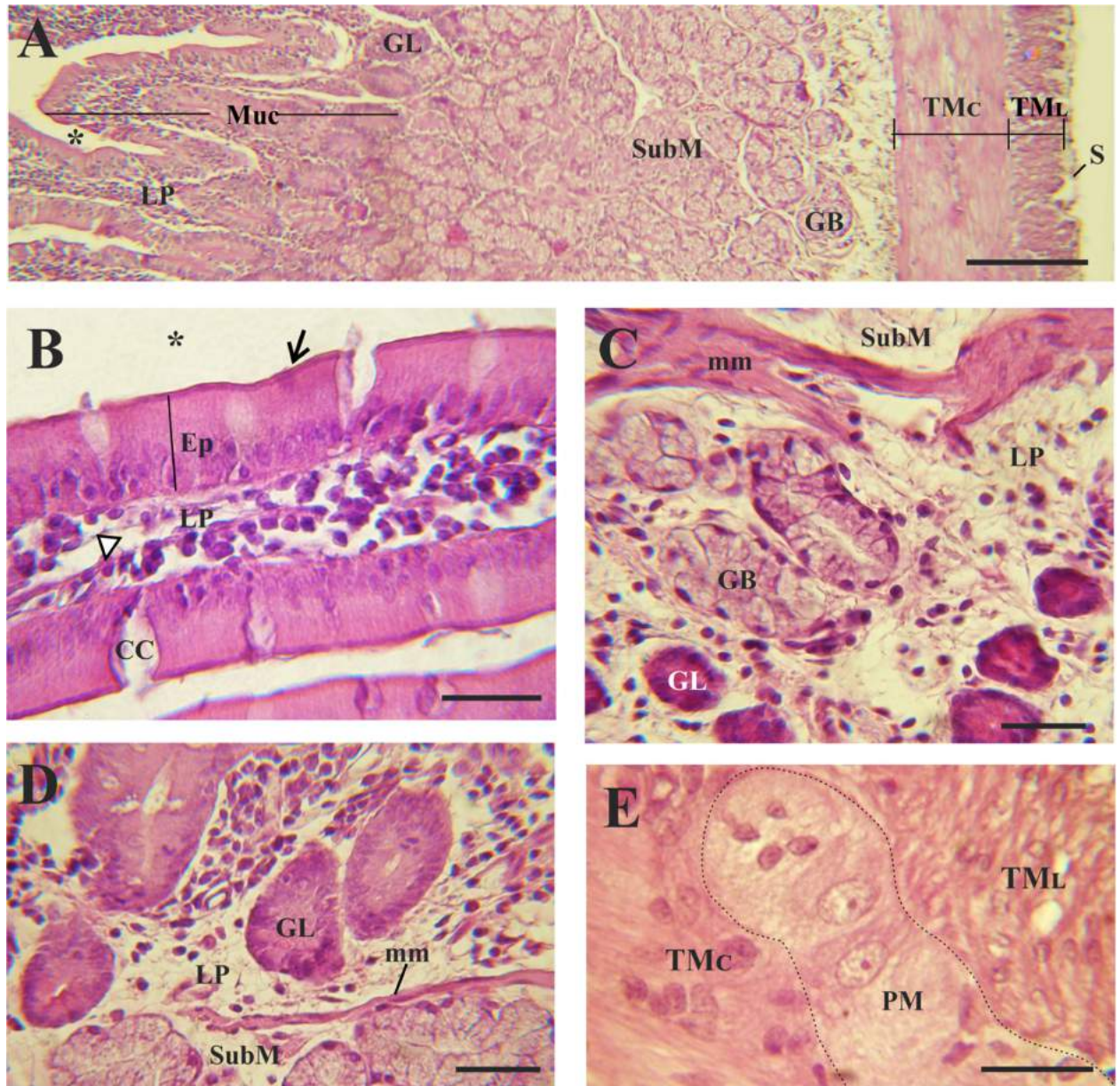


Fig. 1. Caracterización histológica del duodeno de *L. maximus*, H-E. (A) Segmento de la pared intestinal. (B) Vellosidad intestinal. (C) Glándulas de Brunner en la lámina propia. (D) Túnica mucosa y submucosa. (E) Túnica muscular y plexo mientérico. CC, célula caliciforme; Ep, epitelio cilíndrico simple; GB, glándulas de Brunner; GL, glándulas de Lieberkühn; LP, lámina propia; mm, muscular de la mucosa; PM, plexo mientérico; Muc, túnica mucosa; S, serosa; SubM, túnica submucosa; TM<sub>C</sub>, capa circular interna de la túnica muscular; TM<sub>L</sub>, capa longitudinal externa de la túnica muscular; glicocáliz (→); células musculares lisas (▽); lumen (\*). Barras: 100  $\mu$ m (A); 30  $\mu$ m (B-E).



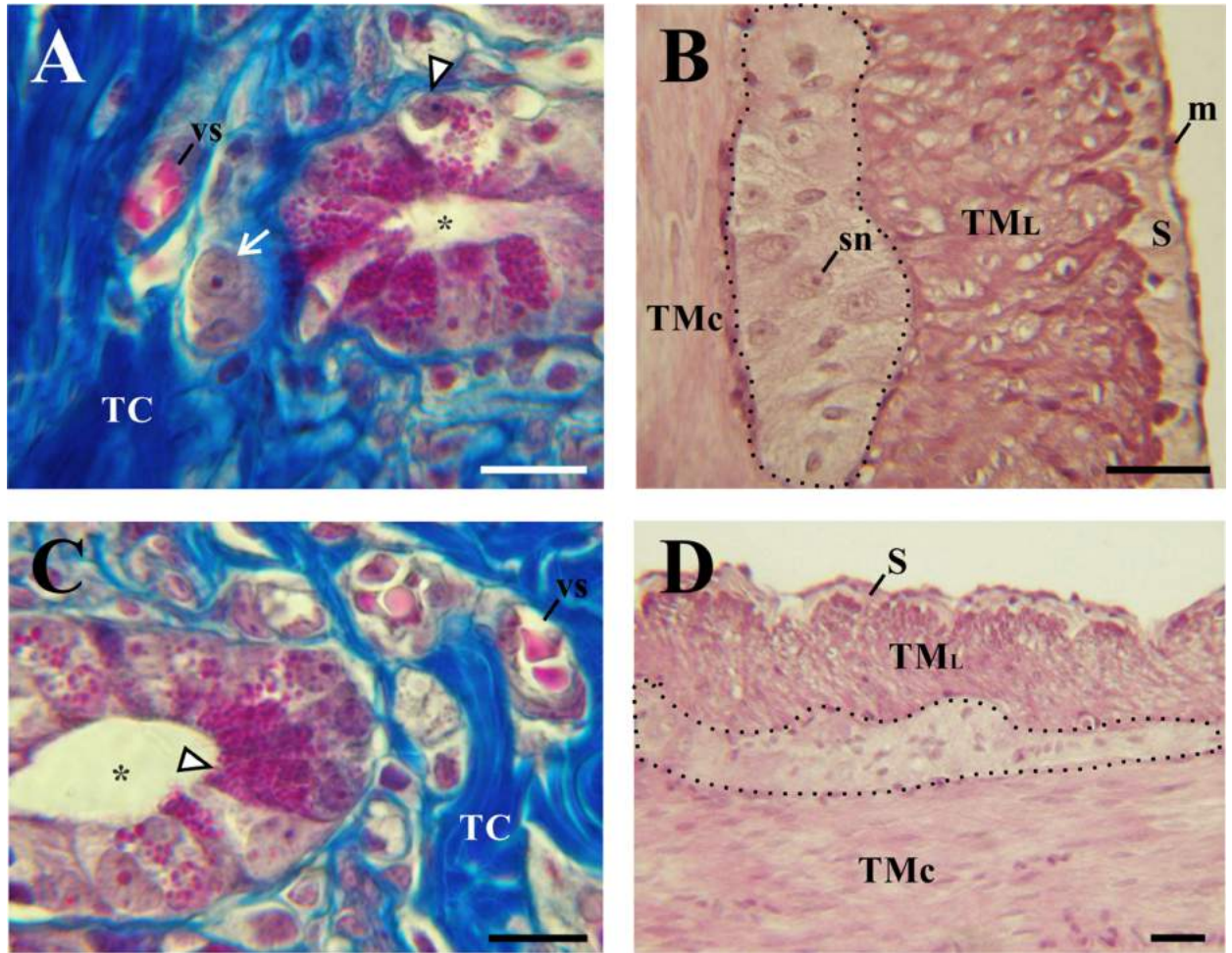


Fig. 2. Caracterización histológica del yeyuno (A, B) e íleon (C, D) de *L. maximus*. (A) Fondo de una cripta de Lieberkühn con células de Paneth (cabeza de flecha), tricrómico de Masson. (B) Plexo mientérico (línea punteada), H-E. m, mesotelio; S, serosa; sn, somas neuronales; TC, tejido conjuntivo; TM<sub>C</sub>, capa circular de la túnica muscular; TM<sub>L</sub>, capa longitudinal de la túnica muscular; vs, vaso sanguíneo; lumen de la glándula intestinal (\*); célula ganglionar del plexo submucoso (→). Barras: 20  $\mu$ m.

## 1.2 Características ultraestructurales

Los enterocitos exhibieron diferencias estructurales entre la región apical, lateral y basal de la célula por lo que presentaron una marcada polaridad morfológica. En su superficie apical se identificaron numerosas microvellosidades uniformes y de distribución regular. Otra característica citológica observada en estas células absortivas fue la presencia de complejos de unión entre células epiteliales vecinas (Fig. 3A). Su citoplasma presentó ribosomas, cisternas de retículo endoplasmático rugoso, un aparato de Golgi perinuclear y agregaciones apicales de mitocondrias (Fig. 3A-C). En el íleon se identificaron dos tipos morfológicos de enterocitos que difirieron principalmente en la electron-densidad de su citoplasma; la mayoría de las células absortivas presentaron un citoplasma electron-lúcido ( $E_L$ ) mientras que un número menor de enterocitos exhibieron un citoplasma electron-denso ( $E_D$ ) (Fig. 3D). Los dos tipos de enterocitos mostraron características ultraestructurales similares. Al igual que en el resto del tracto intestinal, ambos tipos celulares presentaron un núcleo eucromático de ubicación basal y numerosas mitocondrias en el citoplasma apical (Fig. 3D). En los enterocitos claros, la electron-densidad citoplasmática fue menor que la de la matriz mitocondrial, mientras que el otro tipo celular exhibió una electron-densidad similar en ambos compartimentos celulares (Fig. 3D, E).

Las células caliciformes exhibieron su citoplasma apical distendido por la acumulación de numerosos gránulos de mucinógeno. Estas glándulas unicelulares presentaron una región basal estrecha donde se ubican la mayoría de los orgánulos (Fig. 4A-C). Se observaron varias células caliciformes liberando su producto de secreción (Fig. 4c), así como células caliciformes con gránulos de mucus intactos (Fig. 4A-C).

Las células enteroendocrinas se identificaron en la parte inferior de las criptas de Lieberkühn y se caracterizaron por contener numerosos gránulos secretorios electron-densos en su citoplasma basal y perinuclear (Fig. 4d, D). Los gránulos variaron considerablemente en forma y tamaño (Fig. 4D).

Las células de Paneth presentaron numerosos gránulos apicales de densidad electrónica variable, un aparato de Golgi supranuclear y un retículo endoplasmático rugoso muy desarrollado (Fig. 5A, a, B, b, F). La mayoría de los gránulos secretores exhibieron una matriz homogénea de densidad electrónica moderada; otros mostraron una estructura bipartita con un centro electron-denso y una región periférica de menor densidad (Fig. 5C). La electron-densidad de los gránulos varió relativamente de una célula a otra, observándose sólo en algunas células de Paneth gránulos con una semi luna de alta electron-densidad (Fig. 5D). Entre las células de Paneth se observaron uniones de adhesión puntual denominadas macula adherens o desmosomas (Fig. 5E, F).

En la submucosa duodenal se identificaron los adenómeros de las glándulas de Brunner formados por células mucosas de forma piramidal. Estas células glandulares presentaron escasas microvellosidades cortas en su superficie luminal y numerosos repliegues de la membrana lateral (Fig. 6A, C, D). Las células mucosas exhibieron gránulos electron-lúcidos en su citoplasma apical, abundantes mitocondrias, un extenso retículo endoplasmático rugoso y un aparato de Golgi supranuclear (Fig. 6B-D).

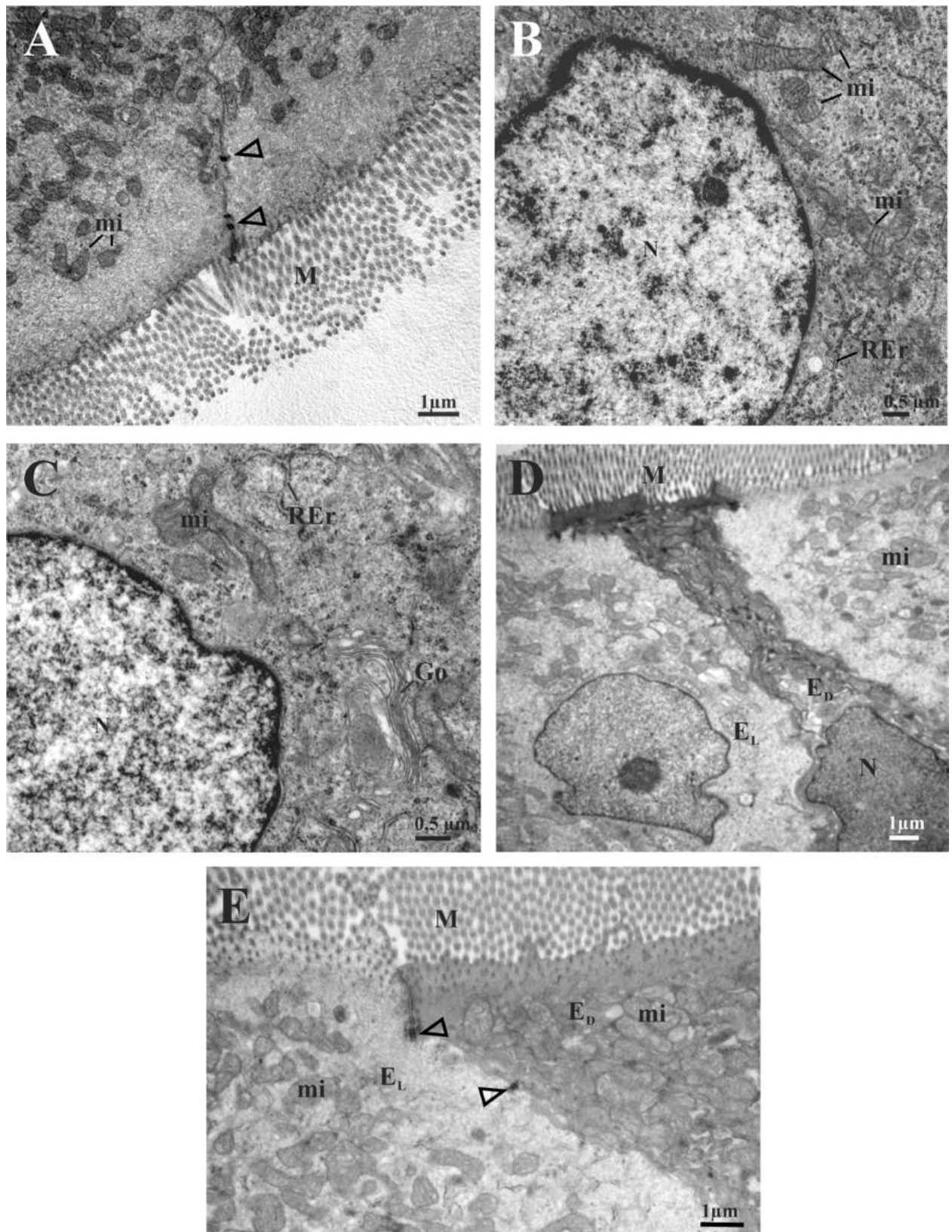


Fig. 3. Características ultraestructurales de los enterocitos del intestino delgado de *L. maximus*. (A) Microfotografía electrónica de la región apical de dos enterocitos contiguos, yeyuno. (B, C) Región citoplasmática perinuclear. (D, E) Microfotografía en la que se reconocen dos tipos de enterocitos que difieren en la electron-densidad de su citoplasma. E<sub>D</sub>, enterocito electron-denso; E<sub>L</sub>, enterocito electron-lucido; Go, Aparato de Golgi; M, microvellosidades; mi, mitocondria; N, núcleo; REr, retículo endoplasmático rugoso; complejos de unión (Δ).



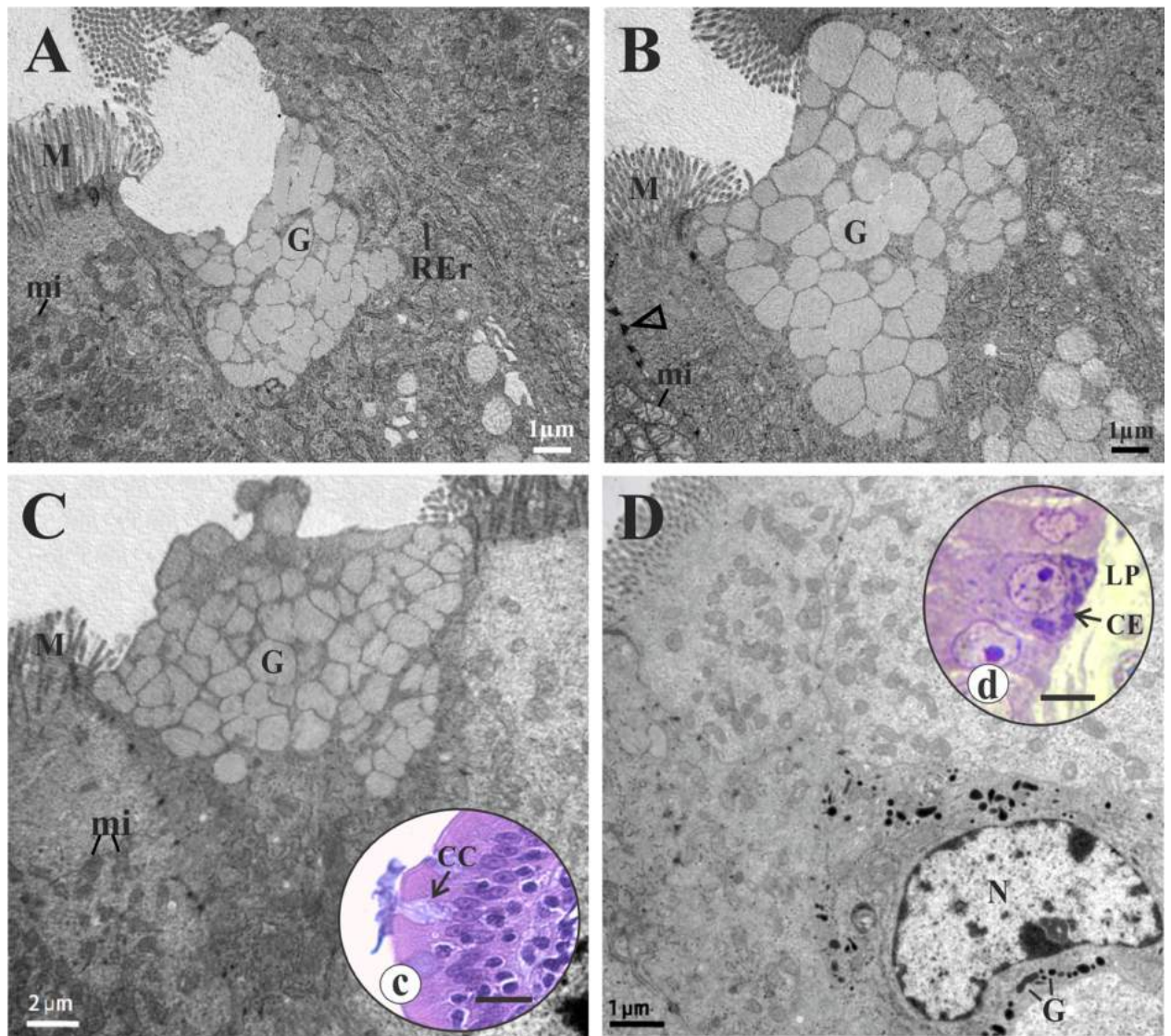


Fig. 4. Microfotografías electrónicas de células epiteliales del intestino delgado de *L. maximus*. (A–C) Células caliciformes con gránulos de mucinógeno electron-lúcidos que distienden la región apical de la célula. (c) Célula caliciforme en exocitosis, barra: 10 μm (microscopia óptica, H-E). (D) Célula enteroendocrina con gránulos secretorios densos en la región basal y perinuclear de la célula. (d) Célula enteroendocrina en un corte semifino, barra: 10 μm (microscopia óptica, Azul de Toluidina). CE, célula enteroendocrina; G, gránulos de secreción; CC, célula caliciforme; LP, lámina propia; M, microvellosidades; mi, mitocondria; N, núcleo; RER, retículo endoplasmático rugoso; complejos de unión (Δ).



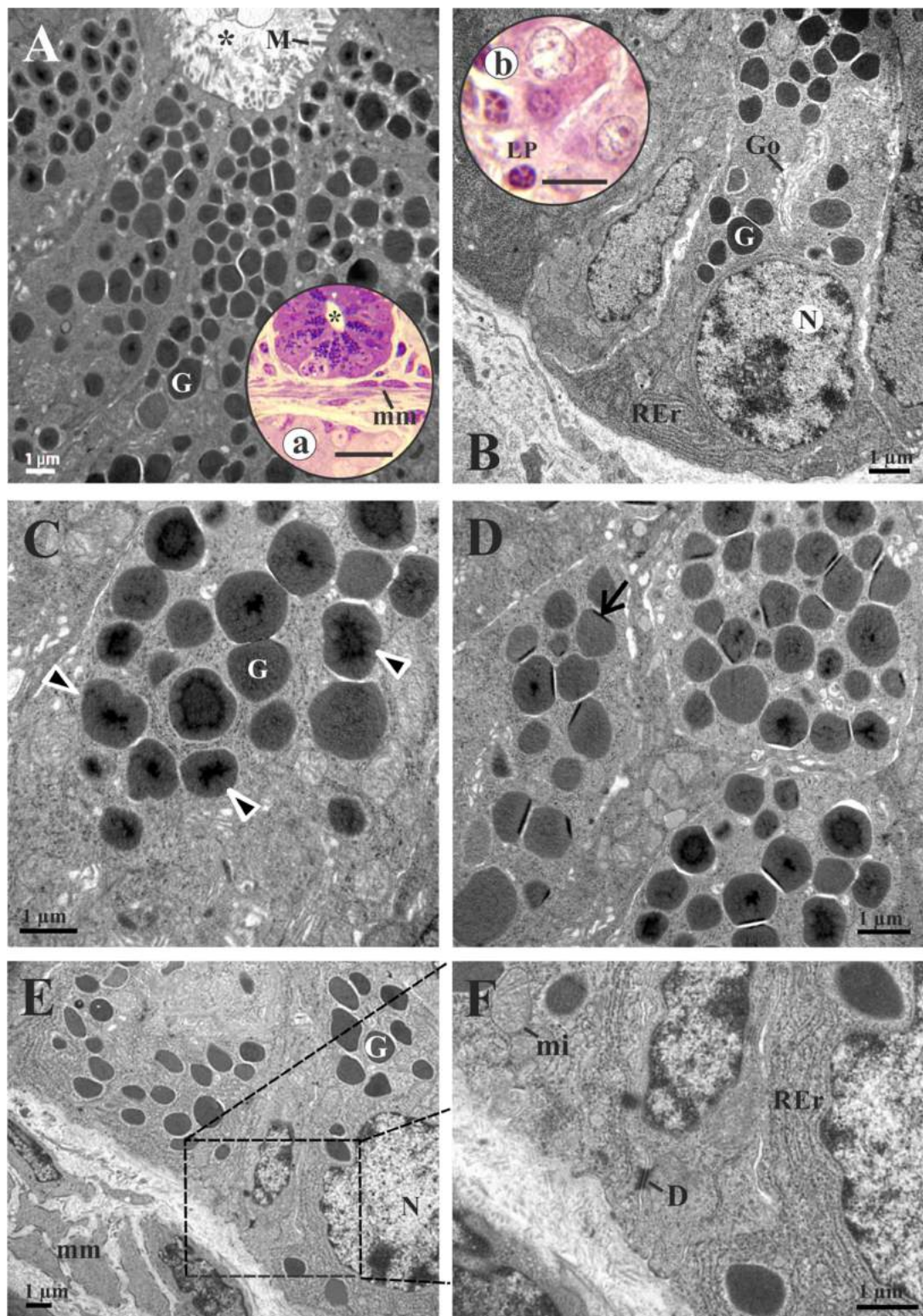


Fig. 5. Características ultraestructurales de las células de Paneth. (A) Células de Paneth en la base de una glándula intestinal. (a) Esta microfotografía muestra la base de una glándula intestinal (yeyunal) en un corte semifino con numerosas células de Paneth, barra: 10  $\mu\text{m}$  (microscopía óptica, Azul de Toluidina). (B) Célula de Paneth en la que se observa un aparato de Golgi supranuclear y un RER muy desarrollado. (b) Célula de Paneth con gránulos eosinófilos apicales, barra: 10  $\mu\text{m}$  (microscopía óptica, H-E). (C) Detalle de los gránulos secretorios. Este mayor aumento permite notar la estructura bipartita de algunos gránulos (cabeza de flecha). (D) Detalle de gránulos secretorios con semi luna de alta electron-densidad (flecha). (E) Región basal de una célula de Paneth. (F) Detalle a mayor aumento de la Figura E. D, desmosoma; G, gránulos secretorios; Go, Golgi; LP, lámina propia; M, microvellosidades; mi, mitocondria; mm, muscular de la mucosa; N, núcleo; RER, retículo endoplasmático rugoso; lumen (\*).

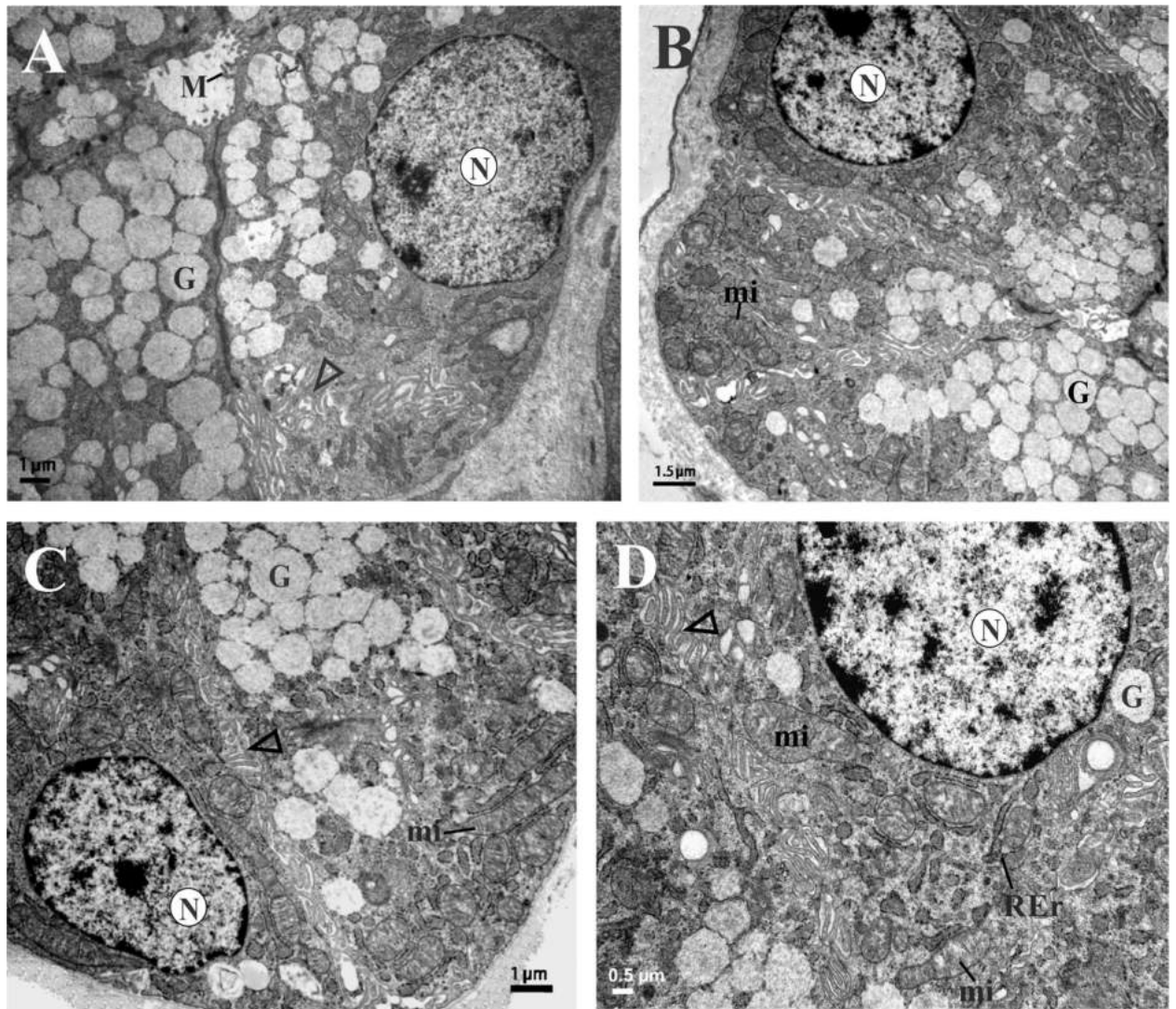


Fig. 6. Microfotografías electrónicas de las glándulas de Brunner (submucosas). Cabeza de flecha, repliegues de la membrana lateral; G, gránulos de mucinógeno; M, microvellosidades; mi, mitocondrias; N, núcleo; REr, retículo endoplasmático rugoso.

### 1.3 Histoquímica para glicoconjugados

A lo largo del eje cráneo caudal del intestino delgado, las células caliciformes exhibieron GCs carboxilados y sulfatados (Figs. 7A; 9A-C y 10A-C), con dioles vecinos oxidables (Figs. 7C, D; 9D y 10D), sialomucinas (Figs. 9F y 10G) y azúcares neutros con O-acil sustituciones (Figs. 9G y 10H). Además, la técnica AB pH 2,8/PAS permitió identificar células caliciformes con dos perfiles histoquímicos diferentes (Figs. 7E; 9E y 10E, F). La mayoría de las células presentaron una secreción mixta de GCs ácidos y neutros (reacción AB/PAS positiva) mientras que una menor proporción de estas glándulas unicelulares exhibió únicamente mucinas neutras (reacción PAS positiva).

Aunque el perfil histoquímico de las células caliciformes presentó similitudes entre las tres regiones anatómicas estudiadas, el análisis histoquímico de GCs demostró que el patrón de glicosilación de estas células varía a lo largo del tracto intestinal (Tabla 4). Se observó un gradiente creciente de sulfomucinas desde el duodeno al íleon (Figs. 9B, C; 10B, C), asociado con un gradiente inverso de GCs neutros y con la presencia de residuos de ácido siálico (Figs. 9F, G y 10G, H). Las sialomucinas se caracterizaron por estar altamente O-acetiladas en la región proximal y media del intestino delgado. Por otro lado, la técnica AT a ambos valores de pH reveló la existencia de células caliciformes metacromáticas en la base de las glándulas de Lieberkühn del duodeno, mientras que en el resto del tracto intestinal esta reacción se presentó a lo largo de todo el eje cripta-villosidad (Figs. 9H, I y 10I, J).

En la túnica submucosa duodenal las técnicas AB pH 2,8 y pH 1,0 permitieron definir dos áreas, denominadas superficial y profunda (Tabla 5). Las glándulas de Brunner de la zona superficial de la submucosa presentaron un patrón de glicosilación diferente al de los adenómeros que se encuentran próximos a la túnica muscular (Figs. 7B, F y 8). Si bien todas las glándulas duodenales fueron PAS positivas (Fig. 7D), sólo los adenómeros de la zona profunda exhibieron sulfomucinas y GCs polianiónicos (Figs. 7B y 8A-C). La técnica combinada AB pH

2,8/PAS permitió identificar en las glándulas de Brunner dos tipos diferentes de células mucosas. Las glándulas del área superficial presentaron principalmente células AB/PAS positivas. En cambio, la mayoría de las células de las glándulas del área profunda reaccionaron fuertemente con la técnica de PAS, mientras que unas pocas reaccionaron también con AB (Fig. 7F). Todas las glándulas submucosas presentaron marcación con las técnicas KOH/PA\*/Bh/PAS, KOH/PA\*S y PA/Bh/KOH/PAS (Tabla 5).



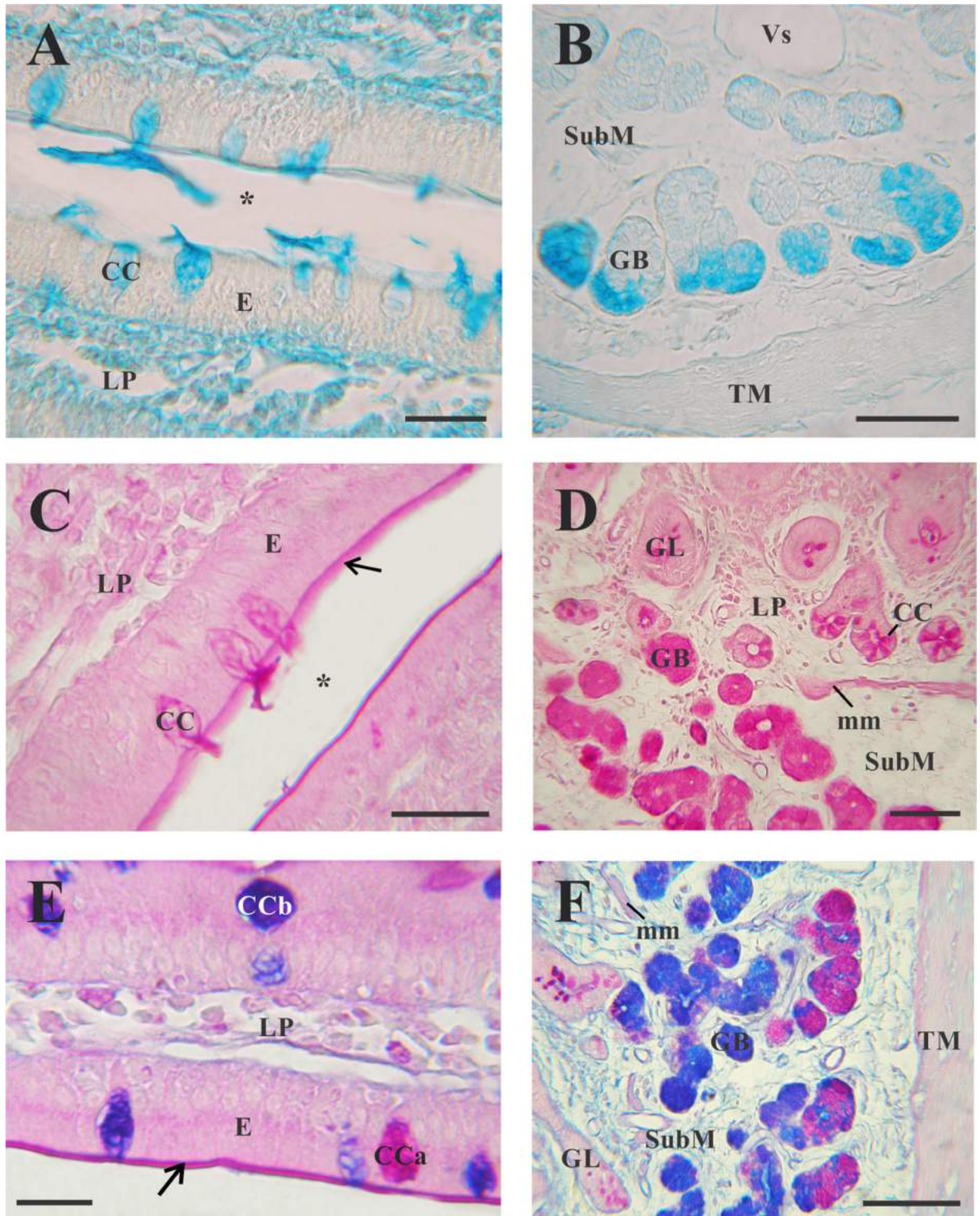


Fig. 7. Caracterización histoquímica del duodeno de *L. maximus*. (A) AB pH 2,8. (B) AB pH 1,0. (C, D) PAS. (E, F) AB pH 2,8/PAS. CC, célula caliciforme; CCa, célula caliciforme PAS positiva; CCb, célula caliciforme AB/PAS positiva; E, epitelio; GB, glándulas de Brunner; GL, glándula de Lieberkühn; LP, lámina propia; mm, muscular de la mucosa; SubM, submucosa; TM, túnica muscular; Vs, vaso sanguíneo; flecha, glicocáliz; lumen (\*). Barras: 20  $\mu$ m (A); 60  $\mu$ m (B); 40  $\mu$ m (C); 80  $\mu$ m (D, F); 30  $\mu$ m (E).

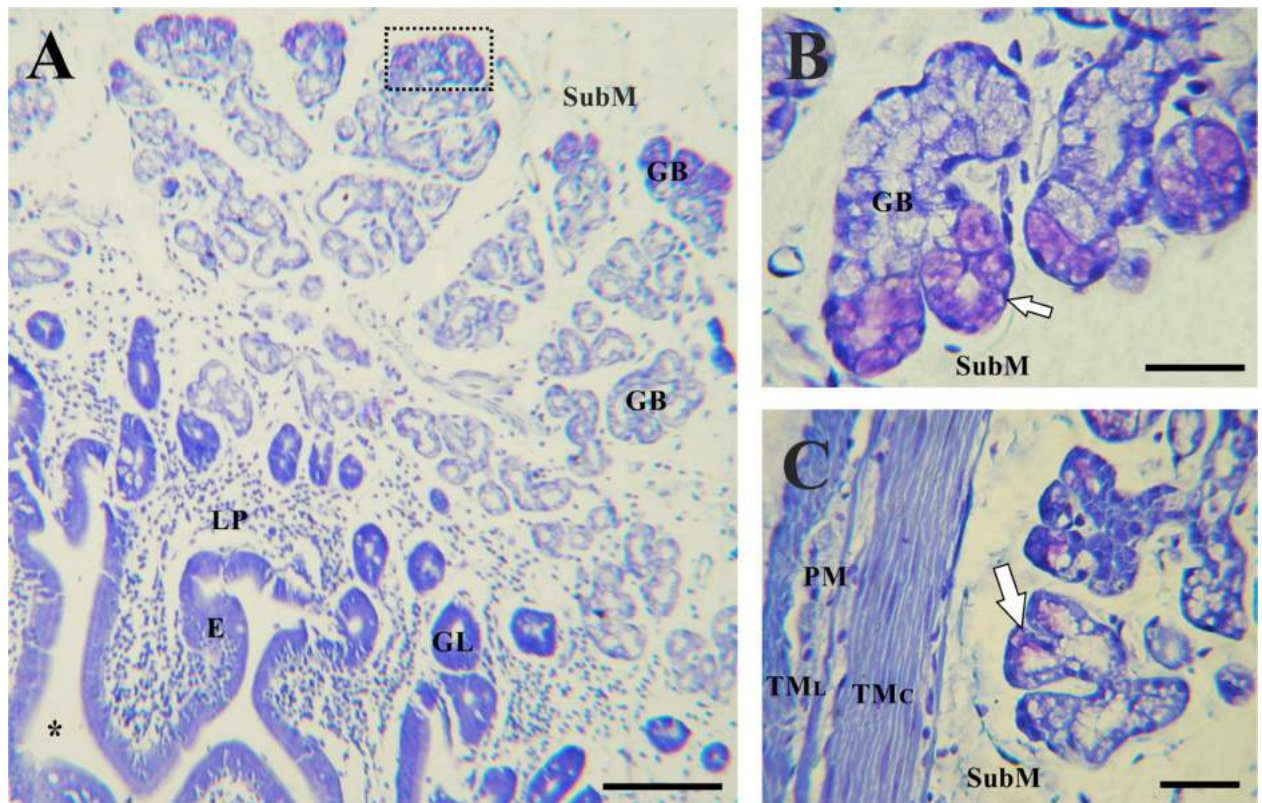


Fig. 8. Caracterización histoquímica de las glándulas de Brunner, AT pH 5,6. (A) Microfotografía de la mucosa y submucosa duodenal. Los adenómeros de la submucosa profunda presentaron reacción metacromática (ver recuadro). (B, C) Glándulas de Brunner con reacción metacromática (flecha). GB, glándulas de Brunner; E, epitelio; GL, glándulas de Lieberkühn; LP, lámina propia; PM, plexo mientérico; SubM, submucosa; TMC, capa circular de la túnica muscular; TML, capa longitudinal de la túnica muscular; lumen (\*). Barras: 100  $\mu$ m (A); 40  $\mu$ m (B, C)



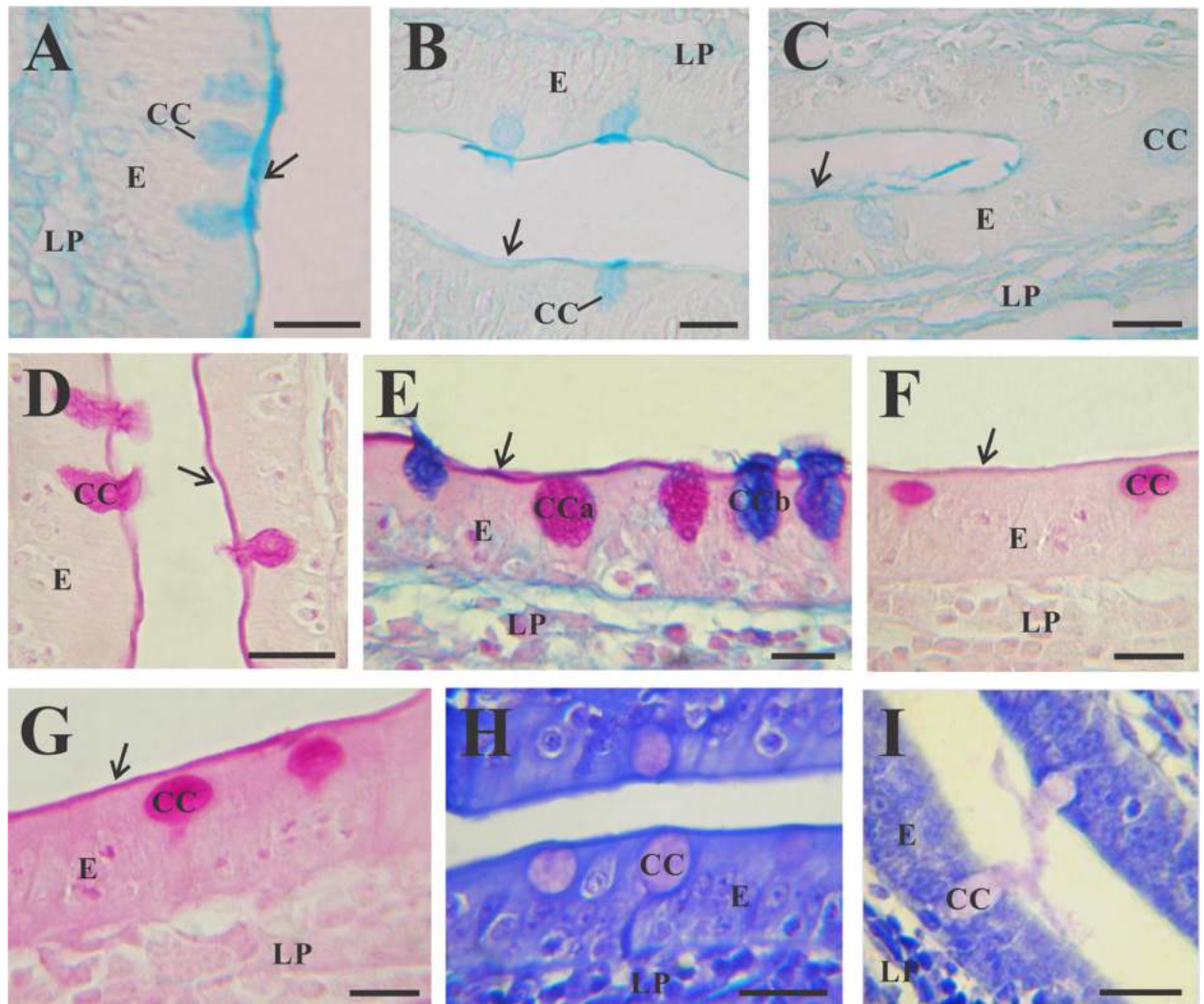


Fig. 9. Caracterización histoquímica de glicoconjugados en el epitelio del yeyuno de *L. maximus*. (A) AB pH 2,8. (B) AB pH 1,0. (C) AB pH 0,5. (D) PAS. (E) AB pH 2,8/PAS. (F) PA/Bh/KOH/PAS. (G) KOH/PA\*/Bh/PAS. (H) AT pH 5,6. (I) AT pH 4,2. E, epitelio; CC, célula caliciforme; CCa, célula caliciforme PAS positiva; CCb, célula caliciforme AB/ PAS positiva; LP, lámina propia; flecha, glicocálix. Barras: 5  $\mu$ m (A, B, E, F, G); 10  $\mu$ m (C, D, H, I).

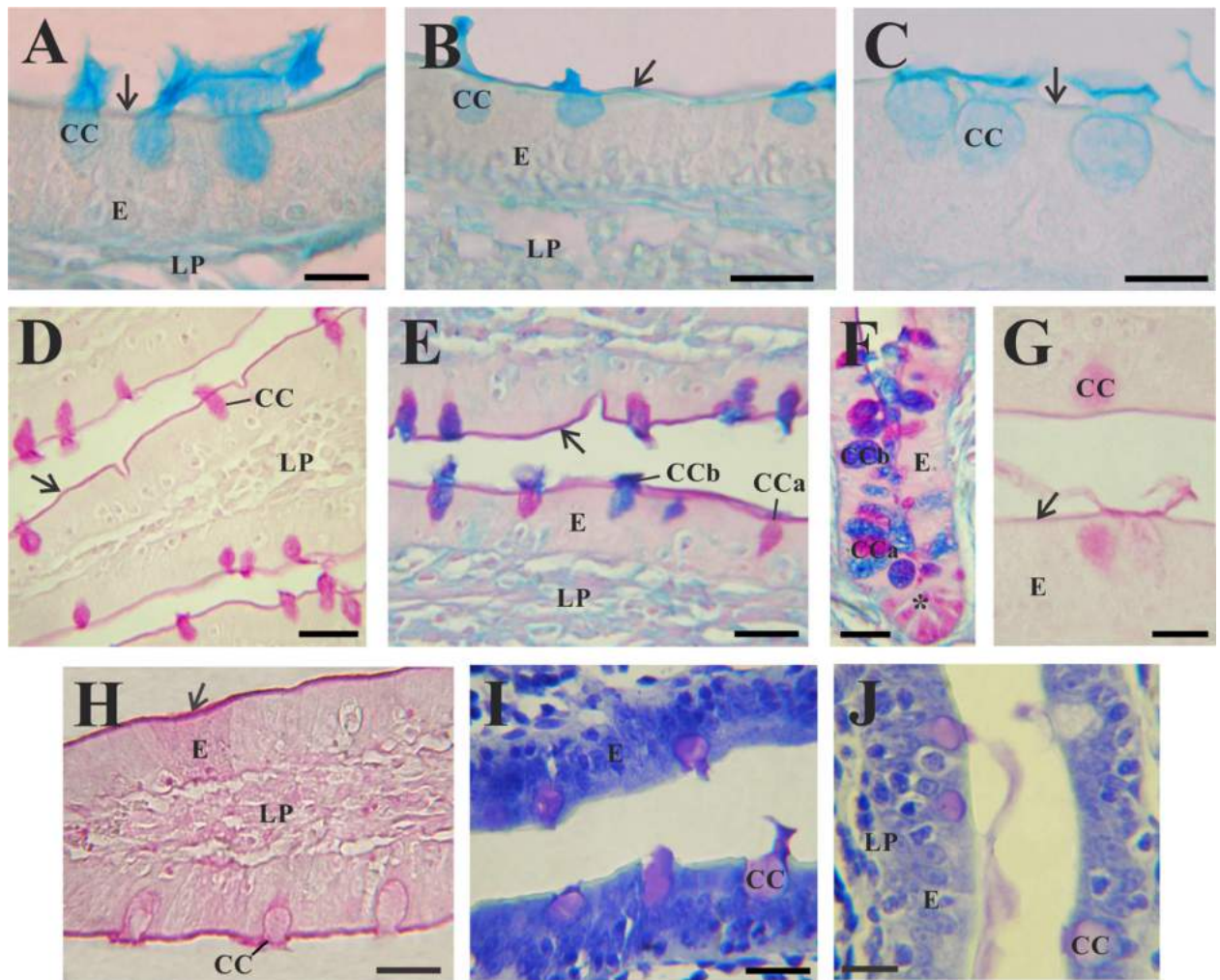


Fig. 10. Caracterización histoquímica de glicoconjugados en el epitelio del íleon de *L. maximus*. (A) AB pH 2,8. (B) AB pH 1,0. (C) AB pH 0,5. (D) PAS. (E, F) AB pH 2,8/PAS. (G) PA/Bh/KOH/PAS. (H) KOH/PA\*/Bh/PAS. (I) AT pH 5,6. (J) AT pH 4,2. CC, célula caliciforme; CCA, célula caliciforme PAS positiva; CCB, célula caliciforme AB/PAS positiva; E, epitelio; LP, lámina propia; flecha, glicocáliz; células de Paneth (\*). Barras: 5  $\mu$ m (A, C, G, H), 10  $\mu$ m (B, D–F, I, J).



**Tabla 4.** Análisis histoquímico del patrón de glicosilación del intestino delgado de *Lagostomus maximus*

Técnicas	Duodeno			Yeyuno			Ileon		
	Glicocáliz	Enterocitos	Células caliciformes	Glicocáliz	Enterocitos	Células caliciformes	Glicocáliz	Enterocitos	Células caliciformes
PAS	3	1	3	3	1	3	3	1	3
$\alpha$ -amilasa/PAS	3	1	3	3	1	3	3	1	3
KOH/PA*S	2	1	3	2	1	2	2	1	2
PA/Bh/KOH/PAS	3	1	3	1	1	2	1	1	1
KOH/PA*/Bh/PAS	3	1	3	3	2	3	3	2	1
AB pH 2,8	2	0	0-3 <sup>a</sup>	2	0	0-3 <sup>a</sup>	2	0	0-3 <sup>a</sup>
AB pH 1,0	2	0	0-1 <sup>a</sup>	2	0	0-1 <sup>a</sup>	2	0	0-2 <sup>a</sup>
AB pH 0,5	0	0	0-1 <sup>a</sup>	1	0	0-1 <sup>a</sup>	1	0	0-2 <sup>a</sup>
AB pH 2,8/PAS	3P	1M	3M-3P <sup>a</sup>	3P	1M	3M-2P <sup>a</sup>	3P	1M	3M-3P <sup>a</sup>
AB pH 1,0/PAS	3P	1M	3M-3P <sup>a</sup>	3P	1M	3M-2P <sup>a</sup>	3P	1M	3M-3P <sup>a</sup>
AT pH 5,6	0-1m <sup>a</sup>	3or	0-1m <sup>a</sup>	3or	3or	3m	0or	3or	3m
AT pH 4,2	0-1m <sup>a</sup>	2or	0-1m <sup>a</sup>	0or	1or	1m	0or	1or	2m

m, metacromasia; M, magenta; or, ortocromasia; P, púrpura.

Intensidad de reacción: 0, negativo; 1, leve; 2, moderado; 3, fuerte.

<sup>a</sup> Se identificaron células caliciformes con diferentes perfiles histoquímicos.

**Tabla 5.** Caracterización histoquímica de las glándulas de Brunner.

Técnicas	Glándulas de Brunner	
	Adenómeros de la región superficial de la submucosa	Adenómeros de la región profunda de la submucosa
PAS	3	3
$\alpha$ -amilasa/PAS	3	3
KOH/PA*S	2	2
PA/Bh/KOH/PAS	3	3
KOH/PA*/Bh/PAS	2	2
AB pH 2,8	3	0-1 <sup>a</sup>
AB pH 1,0	0-1 <sup>a</sup>	2
AB pH 0,5	0-1 <sup>a</sup>	0-1 <sup>a</sup>
AB pH 2,8/PAS	3P	3M
AB pH 1,0/PAS	2P	3P
TB pH 5,6	1or	2m
TB pH 4,2	1m	2m

m, metacromasia; M, magenta; or, ortocromasia; P, púrpura.

Intensidad de reacción: 0, negativo; 1, leve; 2, moderado; 3, fuerte.

<sup>a</sup> Se identificaron células caliciformes con diferentes perfiles histoquímicos.

#### 1.4 Patrón lectinhistoquímico

El método lectinhistoquímico permitió caracterizar residuos terminales y subterminales de azúcares presentes en el glicocálix, los enterocitos, las células caliciformes y las glándulas de Brunner (Tabla 6, Figs. 11-13). Además, la lectina UEA-I evidenció glicanos fucosilados en los gránulos apicales de las células de Paneth de la región media y distal del intestino delgado (Figs. 12E y 13D).

El patrón de unión de las lectinas varió considerablemente según la región anatómica estudiada, las principales diferencias se detectaron en las células caliciformes. Estas células presentaron marcación con las lectinas Con-A, RCA-I, WGA y UEA-I en las tres regiones anatómicas del intestino delgado, aunque con diferentes intensidades (Figs. 11C, E; 12A-D y 13A-D). Las células caliciformes del yeyuno presentaron afinidad por el resto de las lectinas empleadas (Fig. 12F-H), mientras que no se observó marcación en el duodeno con SBA y PNA, y en el íleon con DBA (Figs. 11D y 13G).

Además, en el duodeno las lectinas SBA, DBA y PNA marcaron fuertemente la región supranuclear de los enterocitos (Fig. 11a, b, D). Este mismo patrón se observó en el yeyuno con WGA y UEA-I (Fig. 12c, D).

El glicocálix presentó el mismo perfil lectinhistoquímico en las tres regiones anatómicas; con excepción de las lectinas PNA (Figs. 11D; 12H y 13F) y WGA (Figs. 11E; 12C y 13C).

Todas las lectinas empleadas, excepto PNA, mostraron afinidad por las glándulas de Brunner de la submucosa duodenal (Fig. 11A). DBA fue la única lectina que reaccionó sólo con algunas células mucosas de los adenómeros situados en la submucosa profunda (próximos a la túnica muscular) (Fig. 11B).

**Tabla 6.** Análisis lectinhistoquímico del intestino delgado de *L. maximus*

Lectina		Duodeno	Yeyuno	Íleon
Con-A	<i>Glicocálix</i>	3	3	3
	<i>Enterocitos</i>	1	1	1
	<i>Células caliciformes</i>	1	2	2
	<i>Glándulas de Brunner</i>	1	-	-
WGA	<i>Glicocálix</i>	0	3	0
	<i>Enterocitos</i>	0	1 <sup>a</sup>	0
	<i>Células caliciformes</i>	2	2-3	1
	<i>Glándulas de Brunner</i>	2-3	-	-
DBA	<i>Glicocálix</i>	0	0	0
	<i>Enterocitos</i>	1 <sup>a</sup>	0	0
	<i>Células caliciformes</i>	1	1-2	0
	<i>Glándulas de Brunner</i>	3	-	-
SBA	<i>Glicocálix</i>	0	0	0
	<i>Enterocitos</i>	3 <sup>a</sup>	0	0
	<i>Células caliciformes</i>	0	1-2	1-2
	<i>Glándulas de Brunner</i>	1	-	-
RCA-I	<i>Glicocálix</i>	3	3	3
	<i>Enterocitos</i>	0	0	1
	<i>Células caliciformes</i>	1	2	2
	<i>Glándulas de Brunner</i>	1	-	-
PNA	<i>Glicocálix</i>	3	3	0
	<i>Enterocitos</i>	1 <sup>a</sup>	0	0
	<i>Células caliciformes</i>	0	3	3
	<i>Glándulas de Brunner</i>	0	-	-
UEA-I	<i>Glicocálix</i>	3	3	3
	<i>Enterocitos</i>	0	1 <sup>a</sup>	0
	<i>Células caliciformes</i>	2-3	2	1
	<i>Glándulas de Brunner</i>	2	-	-

Intensidad de reacción: 0, negativo; 1, leve; 2, moderado; 3, fuerte.

<sup>a</sup> Sólo se observó marcación en la región supranuclear de los enterocitos.

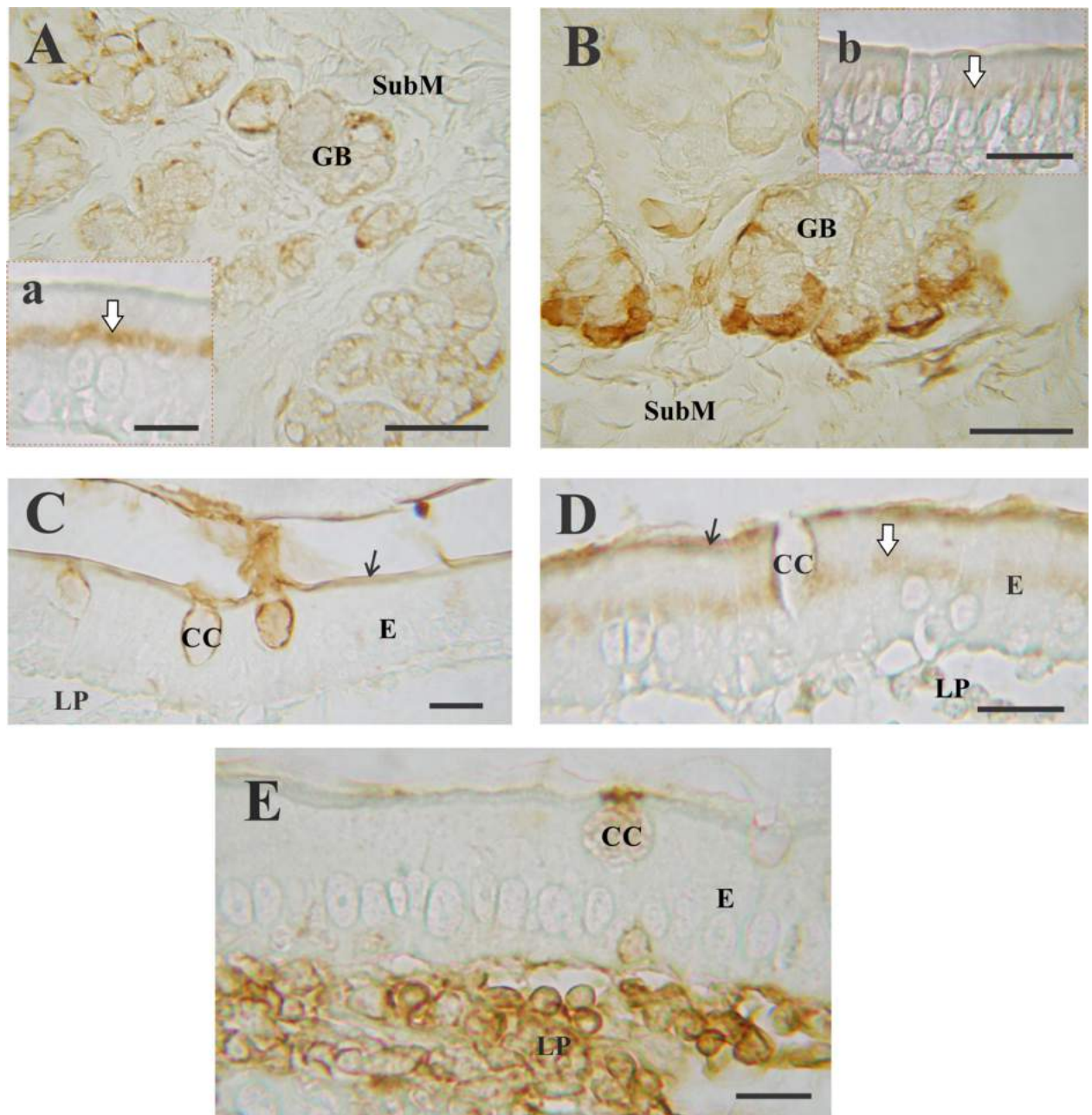


Fig. 11. Patrón lectinhistoquímico del duodeno de *L. maximus*. (A, a) SBA. (B, b) DBA. (C) UEA-I. (D) PNA. (E) WGA. CC, célula caliciforme; E, epitelio cilíndrico simple; GB, glándulas de Brunner; LP, lámina propia; SubM, túnica submucosa; fecha, glicocálix; fecha de barra, gránulos supranucleares. Barras: 80  $\mu$ m (A, B); 20  $\mu$ m (c, E); 30  $\mu$ m (b, C, D).



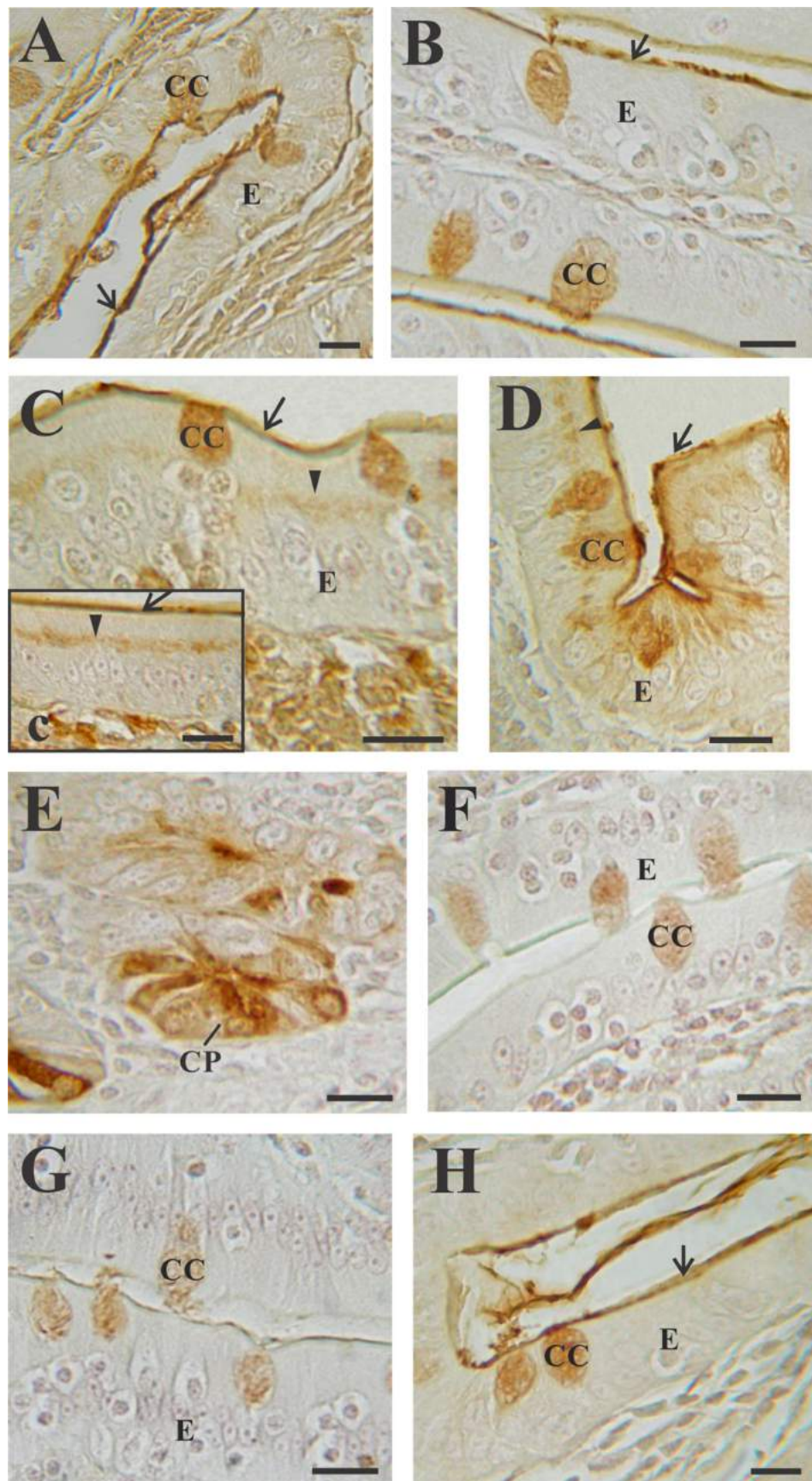


Fig. 12. Patrón lectinhistoquímico del yeyuno de *L. maximus*. (A) Con-A. (B) RCA-I. (C, c) WGA. (D) UEA-I. (E) Células de Paneth con residuos fucosilados, UEA-I. (F) DBA. (G) SBA. (H) PNA. CC, célula caliciforme; CP, célula de Paneth; E, epitelio; flecha, glicocáliz; cabeza de flecha, gránulos supranucleares. Barra: 5 μm.

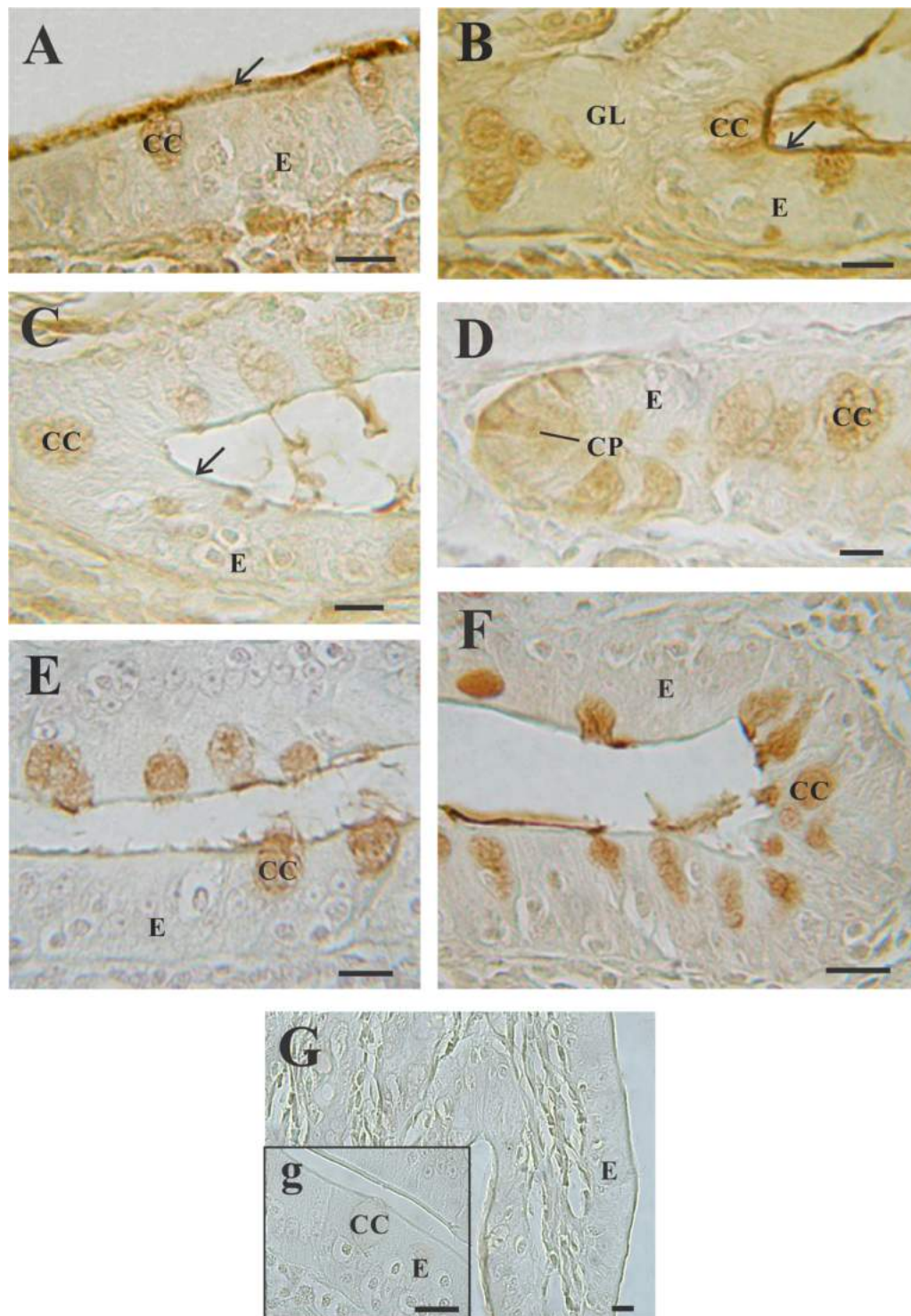


Fig. 13. Patrón lectinhistoquímico del íleon. (A) Con-A. (B) RCA-I. (C) WGA. (D) Células de Paneth con residuos fucosilados, UEA-I. (E) SBA. (F) PNA. (G, g) DBA. CC, célula caliciforme; CP, célula de Paneth; E, epitelio; GL, glándula de Lieberkühn; flecha, glicocálix. Barra: 5  $\mu$ m.

## 1.5 Inmunohistoquímica anti-c-kit y patrón lectinhistoquímico de las ICC

Por el método inmunohistoquímico se evidenciaron diferentes poblaciones de ICC en el intestino delgado de *L. maximus* (Fig. 14). El duodeno presentó mayor inmunomarcación a nivel del plexo mientérico. Las células c-kit positivas de esta región se encontraron en íntima relación con las células ganglionares y presentaron forma estrellada con prolongaciones delgadas e interdigitadas (Fig. 15A). También se observaron escasas células marcadas en la capa circular interna de la túnica muscular.

En el yeyuno, la técnica IHQ anti-c-kit evidenció células positivas en la región del plexo mientérico y en todo el espesor de la túnica muscular (Fig. 15B).

Por último, el plexo mientérico del íleon también se encontró rodeado por células c-kit positivas de aspecto estrellado. Además, se identificaron células inmunomarcadas asociadas con el plexo muscular profundo y en ambas capas de la túnica muscular. Estas células presentaron procesos poco ramificados que se orientan según la dirección del eje mayor de las fibras musculares (Fig. 15C).

Las dimensiones, obtenidas por técnicas morfométricas, de las células inmunomarcadas en los tres segmentos del intestino delgado se detallan en la tabla 7. A partir del análisis estadístico de los resultados morfométricos es posible concluir que no se encontraron diferencias significativas entre los tres segmentos del intestino delgado para ninguno de los parámetros evaluados (Anexo, Tablas 14-17). Estos resultados permiten inferir que las células de dichos sectores tienen un tamaño y una forma similar.

Con respecto al patrón lectinhistoquímico, sólo las lectinas Con-A, WGA y RCA-I presentaron afinidad por las células relacionadas con el plexo mientérico de las tres regiones anatómicas del intestino delgado. Además, con estas lectinas se observaron prolongaciones celulares en el tejido conjuntivo intermuscular de los tres sectores estudiados. En el duodeno y yeyuno, Con-A fue la lectina que marcó más intensamente la región del plexo de Auerbach (Fig. 16A, B). En el íleon, en cambio, la lectina que presentó mayor afinidad por las zonas donde se



localizan las ICC fue RCA-I (Fig. 16C). Esta lectina también marcó intensamente la región del plexo muscular profundo del íleon (Fig. 16C).

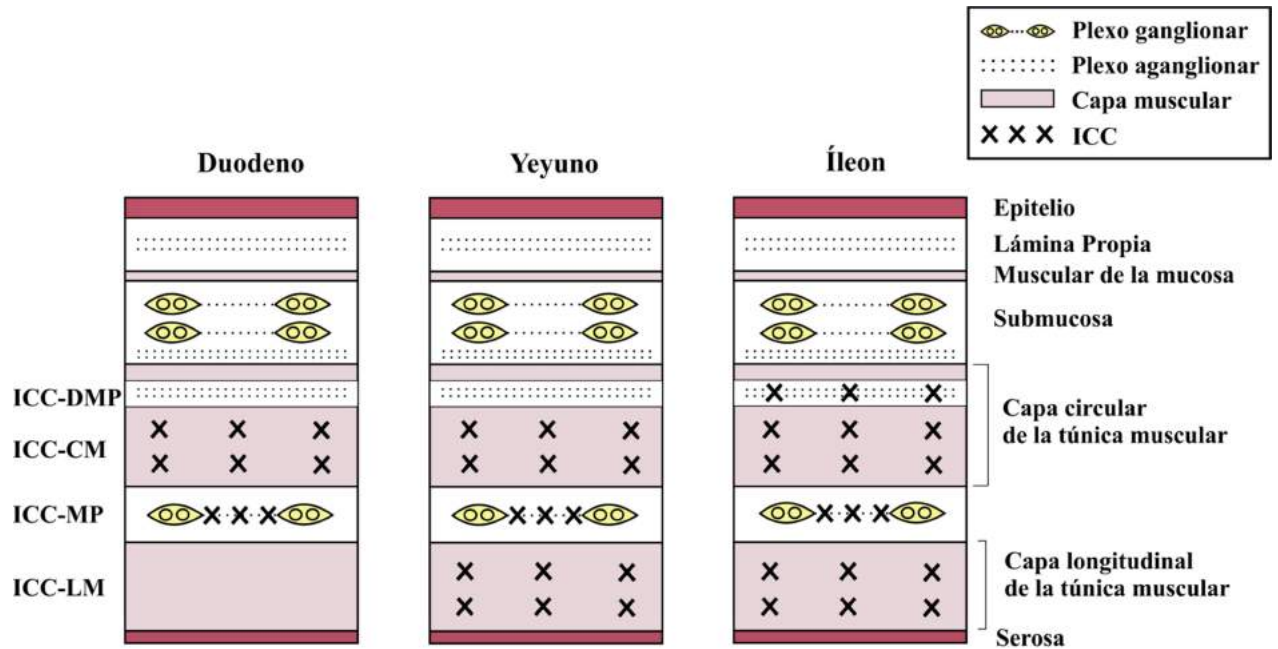


Fig. 14. Localización de células c-kit positivas en el duodeno, yeyuno e íleon de *L. maximus*. ICC-DMP, ICC del plexo muscular profundo; IIC-CM, ICC intramurales de la capa circular; ICC-MP, ICC del plexo mientérico; ICC-LM, ICC intramurales de la capa longitudinal.

**Tabla 7.** Características morfométricas de las células inmunomarcadas anti c-kit en el intestino delgado de *L. maximus*

Intestino delgado	Área ( $\mu\text{m}^2$ )	Eje mayor ( $\mu\text{m}$ )	Eje menor ( $\mu\text{m}$ )	Perímetro ( $\mu\text{m}$ )
Duodeno	89,44 $\pm$ 12,15	18,44 $\pm$ 2,97	7,11 $\pm$ 1,56	44,84 $\pm$ 5,27
Yeyuno	67,38 $\pm$ 13,01	15,58 $\pm$ 3,05	5,084 $\pm$ 0,67	37,15 $\pm$ 6,4
Íleon	79,20 $\pm$ 10,02	18,41 $\pm$ 2,67	6,34 $\pm$ 1,02	46,02 $\pm$ 11,04

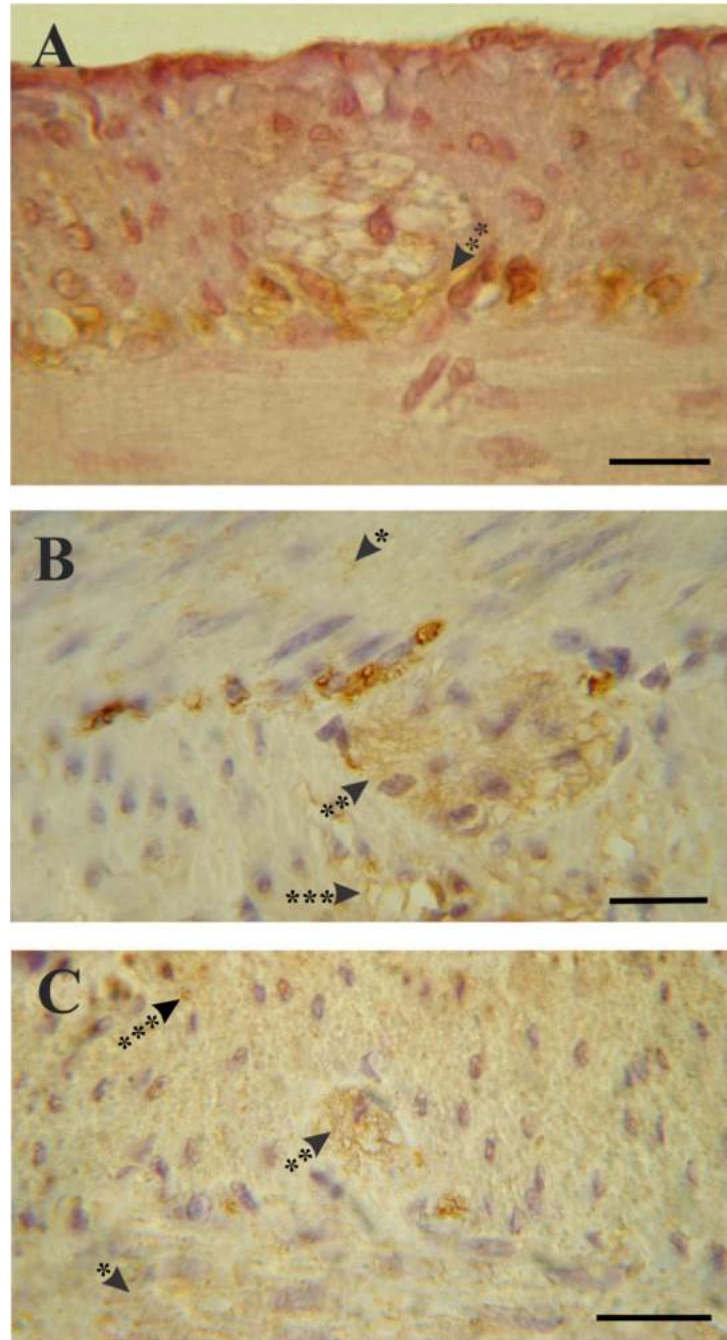


Fig. 15. Identificación de células c-kit positivas en el intestino delgado de *L. maximus*, IHQ anti-c-kit. (A) Duodeno. (B) Yeyuno. (C) Íleon. ◀\* prolongaciones de células positivas en la capa circular de la túnica muscular; ◀\*\* células positivas en la región del plexo mientérico; ◀\*\*\* prolongaciones de células positivas en la capa longitudinal de la túnica muscular. Barra: 10  $\mu$ m (A); 20  $\mu$ m (B-C).

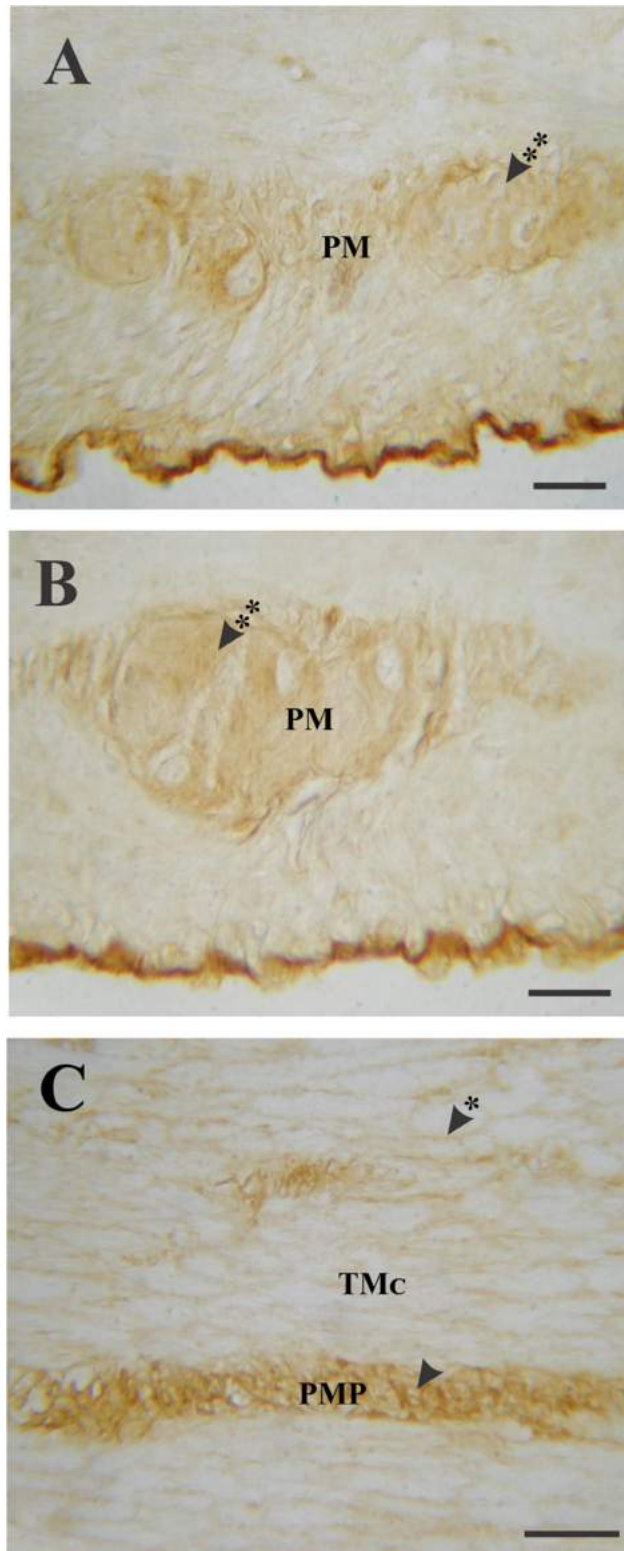


Fig. 16. Caracterización lectinhistoquímica de las ICC en el intestino delgado. (A) Con-A, duodeno. (B) Con-A, yeyuno. (C) RCA-I, íleon. ◄\* célula positiva en el plexo muscular profundo; ◄\* célula positiva en la capa circular de la túnica muscular; ◄\*\* células positivas en la región del plexo mientérico. PM, plexo mientérico; PMP, plexo muscular profundo; TMC, capa circular interna de la túnica muscular. Barras: 20  $\mu$ m.

## 2. INTESTINO GRUESO

### 2.1 Características morfológicas generales

El intestino grueso de *L. maximus* comprendió el ciego, el colon (ascendente y descendente), el recto y el conducto anal. El ciego fue el órgano más voluminoso del tracto intestinal, careció de un apéndice vermiforme y presentó una parte proximal compuesta por la base y el cuerpo, y una región distal alargada que finalizó en el ápice. El ciego y el colon ascendente exhibieron en su superficie externa numerosas saculaciones y proyecciones de la serosa repletas de tejido adiposo (apéndices epiploicos).

La estructura histológica del intestino grueso presentó, en toda su extensión, las cuatro tunicas típicas del tubo digestivo. Si bien el colon ascendente de *L. maximus* exhibió esta misma organización estructural, se detectaron diferencias notables en su morfología.

El colon ascendente presentó a lo largo del lado mesentérico un surco colónico longitudinal. El surco se originó en la proximidad de la unión cecocólica y se encontró limitado en ambos extremos por crestas no papilares (Fig. 17A, B). Estas crestas dividieron el lumen del colon ascendente en dos compartimentos, formando el lumen del surco y un lumen principal de mayor dimensión (Fig. 17A). El espacio que separa a las crestas disminuyó gradualmente a lo largo del colon ascendente produciendo un estrechamiento del surco hacia la región distal del órgano donde finalmente desaparece (Fig. 17C, c). Cada cresta presentó dos bordes laterales: uno que reviste al lumen principal del órgano y otro que limita con el surco colónico denominados lado colónico luminal (CLS) y lado del surco (GS), respectivamente (Figs. 18A y 19). El centro de las crestas consistió en una extensión de la túnica submucosa y se caracterizó por presentar venas de gran calibre (Fig. 18B). La morfología de la túnica muscular del colon ascendente cambió abruptamente a la altura de las crestas. En vez de estar formada por una capa circular interna y otra longitudinal externa, al igual que en la mayoría de las regiones del tubo digestivo, la túnica muscular del surco

exhibió numerosos haces de fibras musculares lisas de disposición circular separados por tabiques de tejido conectivo (Figs. 18A, C y 19). La capa longitudinal externa, en cambio, disminuyó gradualmente de grosor hasta finalmente desaparecer a nivel del surco (Figs. 18D y 19). A pesar de presentar sólo una capa circular, la túnica muscular del surco se caracterizó por ser de mayor grosor que la muscular del resto del órgano.

Además, la túnica muscular del colon ascendente presentó en su región antimesentérica un engrosamiento de la capa longitudinal externa para formar dos bandas longitudinales bien definidas, denominadas tenias del colon (Fig. 20A, B). A diferencia del colon ascendente, el resto de los órganos del tracto intestinal presentaron una capa de músculo longitudinal completa y uniforme (Fig. 20C).

La característica más conspicua del colon descendente y el recto de *L.maximus* fue la gran cantidad de pliegues de la superficie interna, formados por un centro de submucosa, que le imparten un aspecto irregular a la luz intestinal de ambos órganos (Fig. 20C).



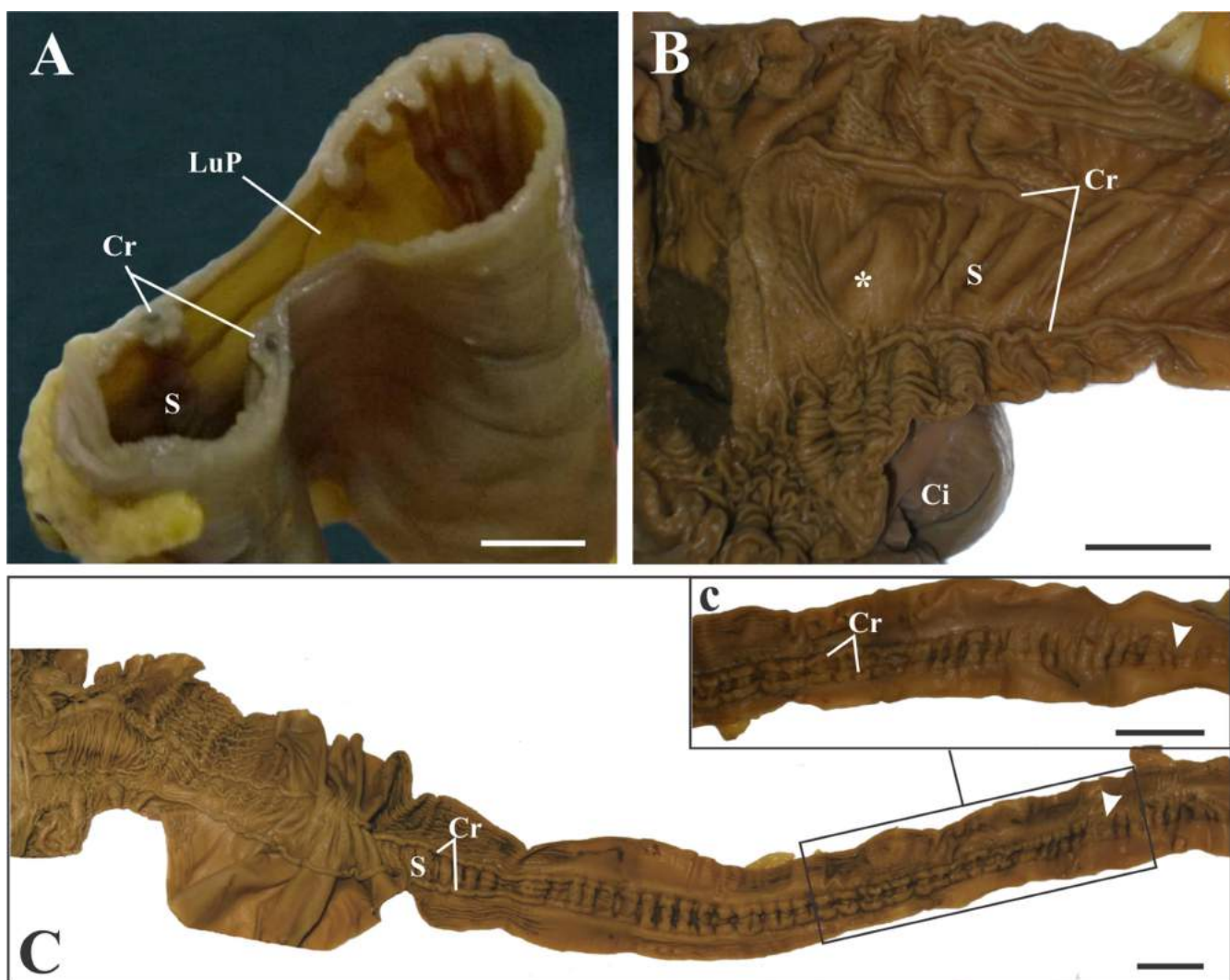


Fig. 17. Caracterización morfológica del surco colónico longitudinal de *L. maximus*. (A) Sección transversal del colon ascendente. (B) Anatomía macroscópica del origen del surco. (C) Vista macroscópica de la superficie interna del colon ascendente. (c) Vista macroscópica de la región caudal del colon ascendente. Cabeza de flecha, región caudal del colon ascendente; Ci, ciego; Cr, cresta; LuP, lumen principal; S, surco; unión cecocólica (\*). Barras: 1 cm (A); 1,5 cm (B, C, c).

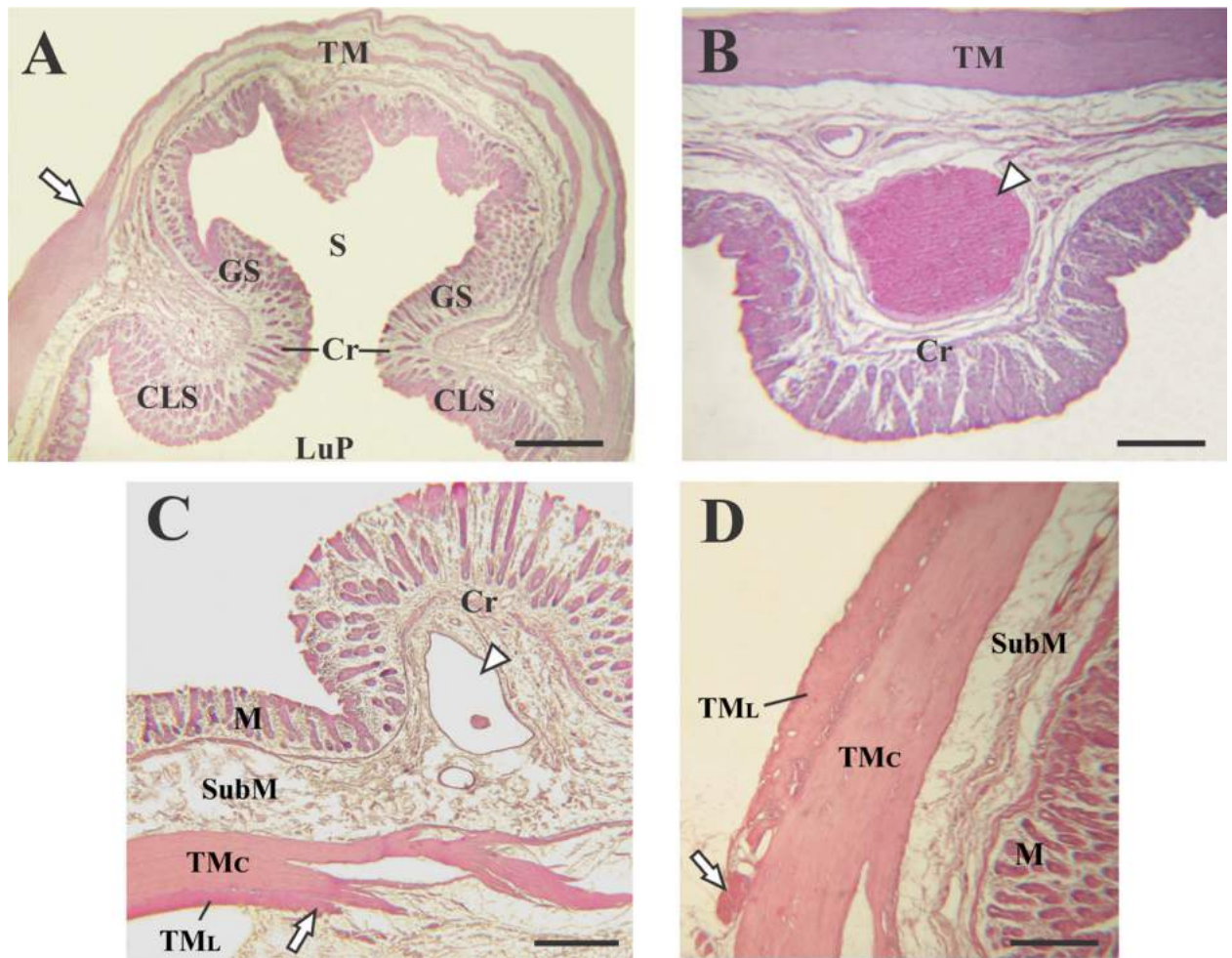


Fig. 18. Caracterización histológica del surco colónico longitudinal de *L. maximus*. (A) Microfotografía del surco, H-E. (B) Cresta no papilar con una vena de gran calibre, H-E. (C) Microfotografía donde se observa con mayor detalle el cambio abrupto en la morfología de la túnica muscular, H-E. (D) Detalle de la túnica muscular, H-E. Cabeza de flecha, vena; CLS, borde lateral de la cresta que limita con el lumen principal; Cr, cresta; flecha de bloque, cambio en la morfología de la túnica muscular; GS, borde lateral de la cresta que limita con el surco; LuP, lumen principal; M, túnica mucosa; SubM, túnica submucosa; TM, túnica muscular; TM<sub>C</sub>, capa circular de la túnica muscular; TM<sub>L</sub>, capa longitudinal de la túnica muscular; S, surco. Barras: 800  $\mu$ m (A); 400  $\mu$ m (B); 250  $\mu$ m (C); 100  $\mu$ m (D).

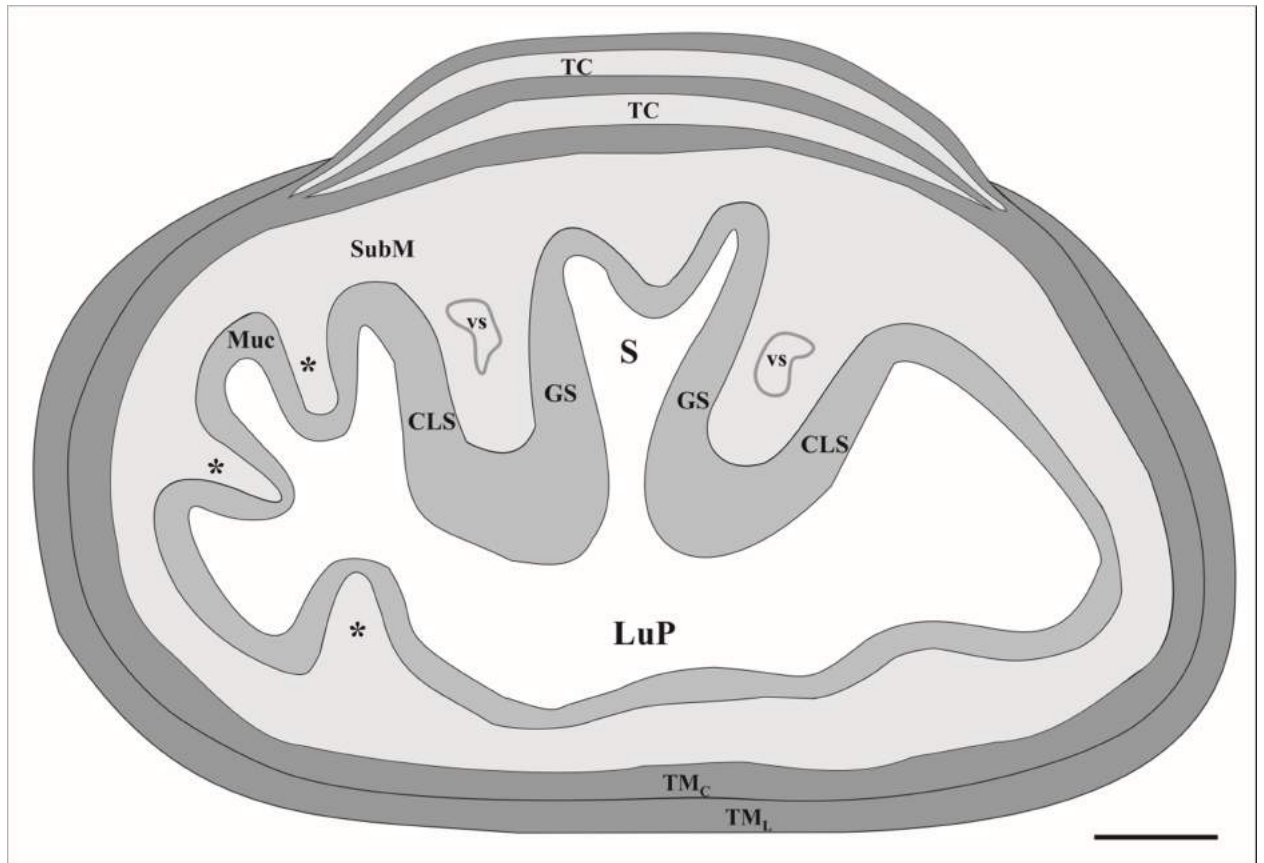


Fig. 19. Esquema de las características histológicas generales del surco colónico (G). CLS, borde lateral de la cresta que limita con el lumen principal; GS, borde lateral de la cresta que limita con el surco; LuP, lumen principal; Muc, túnica mucosa; S, surco; SubM, túnica submucosa; TC, tejido conectivo; TM<sub>C</sub>, capa circular interna de la túnica muscular; TM<sub>L</sub>, capa longitudinal externa de la túnica muscular; vs, vena; pliegues (\*). Barra: 2000 µm.



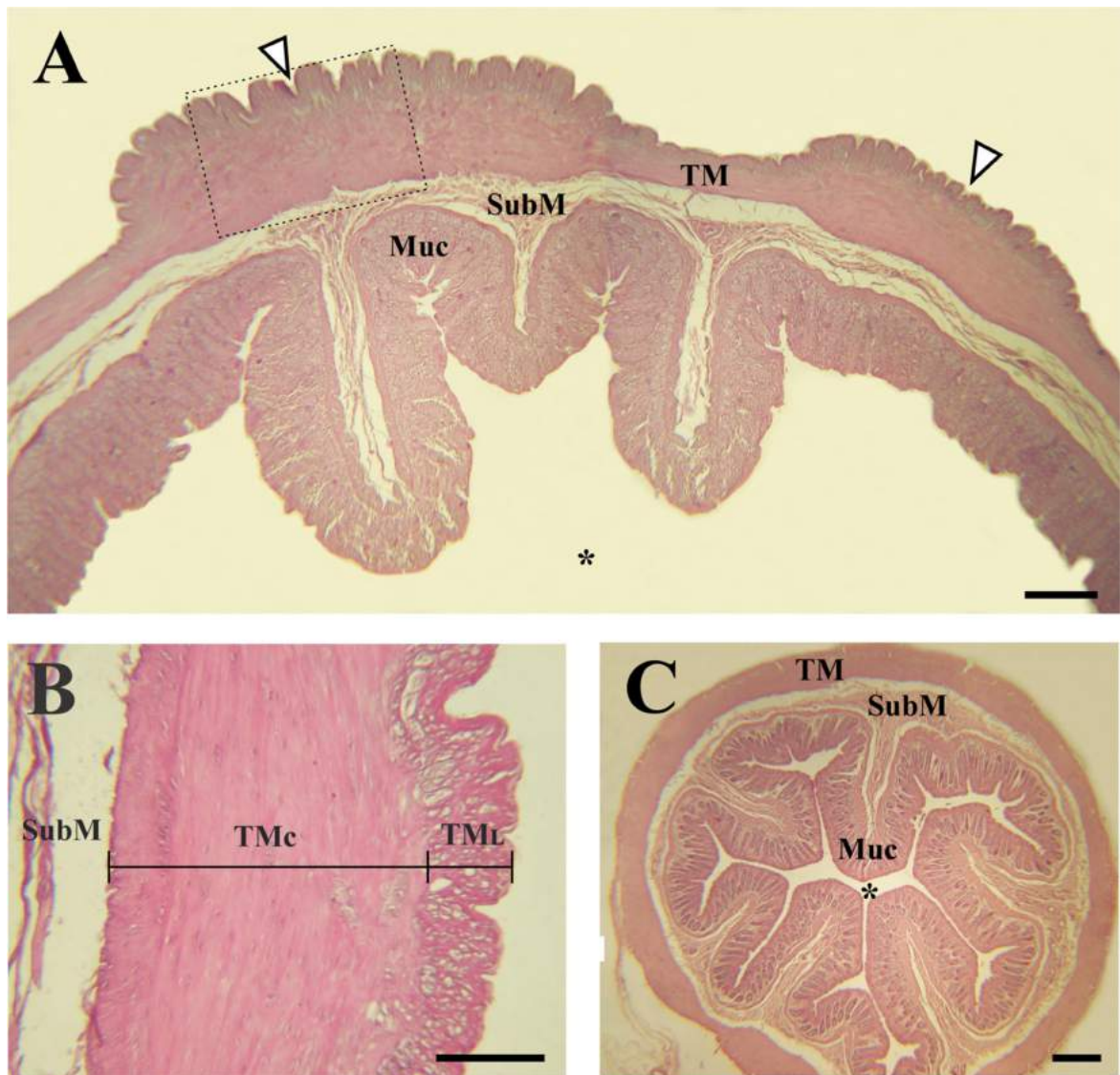


Fig. 20. Caracterización histológica del colon ascendente y descendente de *L. maximus*, H-E. (A) Segmento de la pared del colon ascendente en el que se observan dos bandaletas de musculo liso que reciben el nombre de tenias del colon (cabeza de flecha). (B) Detalle de las capas musculares que conforman las tenias del colon. (C) Corte transversal del colon descendente. Muc, túnica mucosa; SubM, túnica submucosa; TM, túnica muscular; TM<sub>C</sub>, capa circular interna de la túnica muscular; TM<sub>L</sub>, capa longitudinal externa de la túnica muscular; lumen (\*). Barra: 400  $\mu$ m (A, C); 200  $\mu$ m (B).

## 2.2 Características ultraestructurales

El estudio ultraestructural del intestino grueso permitió caracterizar las células absortivas y caliciformes del epitelio (Fig. 21). Al igual que en el intestino delgado, las células absortivas del intestino grueso presentaron polaridad bien definida y exhibieron microvellosidades en su superficie apical y complejos de unión en la región lateral de la membrana (Fig. 21A). El tercio basal de este tipo celular presentó un núcleo eucromático y cisternas del retículo endoplasmático rugoso. Las mitocondrias se localizaron en el citoplasma apical entre el velo terminal y el núcleo (Fig. 21A, B). A diferencia de lo observado en el intestino delgado, todos los enterocitos presentaron un citoplasma electron-lúcido.

Las células caliciformes se distribuyeron a lo largo de todo el eje de la cripta aunque predominaron en la porción profunda de la glándula intestinal (Fig. 21C, D). Al igual que en el intestino delgado, estas glándulas unicelulares presentaron abundantes gránulos de mucinógeno concentrados en el citoplasma apical, microvellosidades y áreas especializadas de adhesión celular.

En el colon ascendente y descendente se identificaron células intersticiales de Cajal en estrecha asociación con el plexo mientérico. Las ICC del colon ascendente presentaron un aspecto estrellado con prolongaciones bifurcadas en estrecho contacto con fibras nerviosas e ICC contiguas (Fig. 22A, B). Su citoplasma se caracterizó por ser electron-denso y presentar grandes mitocondrias. En función de estas características ultraestructurales, las ICC fueron fácilmente distinguidas de los fibroblastos, los cuales presentaron un citoplasma electron-lúcido y abundantes cisternas dilatadas del retículo endoplasmático rugoso. Además, los fibroblastos presentaron invaginaciones de la superficie celular con acumulaciones de fibras colágenas que reciben en nombre de bahías (Fig. 22C).

Las ICC del colon descendente presentaron un cuerpo fusiforme con extensos procesos citoplasmáticos y cavéolas en la membrana celular (Fig. 23).

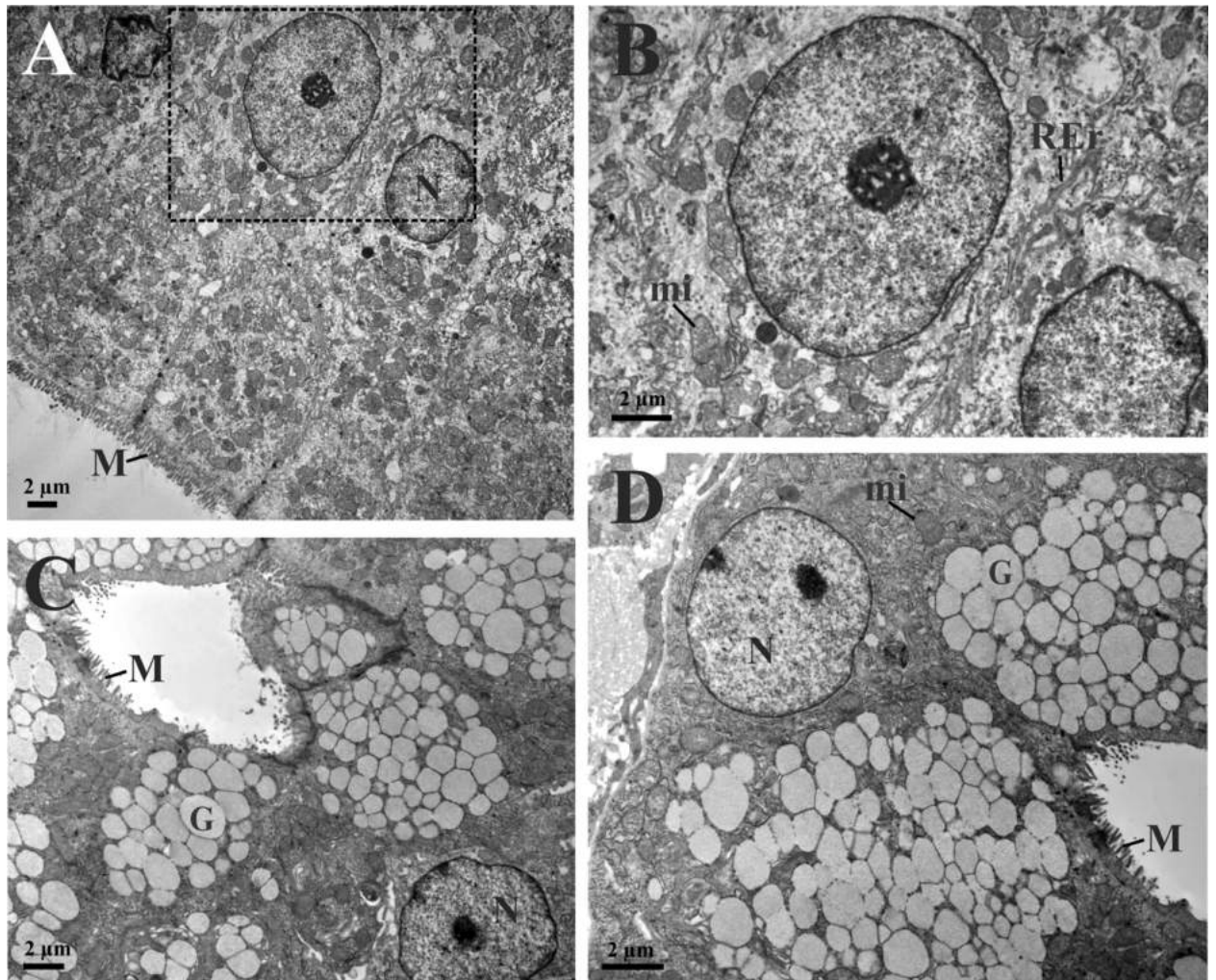


Fig. 21. Características ultraestructurales de los enterocitos (A, B) y células caliciformes (C, D) del intestino grueso de *L. maximus*. G, gránulos secretorios; M, microvellosidades; mi, mitocondria; N, núcleo; REr, retículo endoplasmático rugoso.

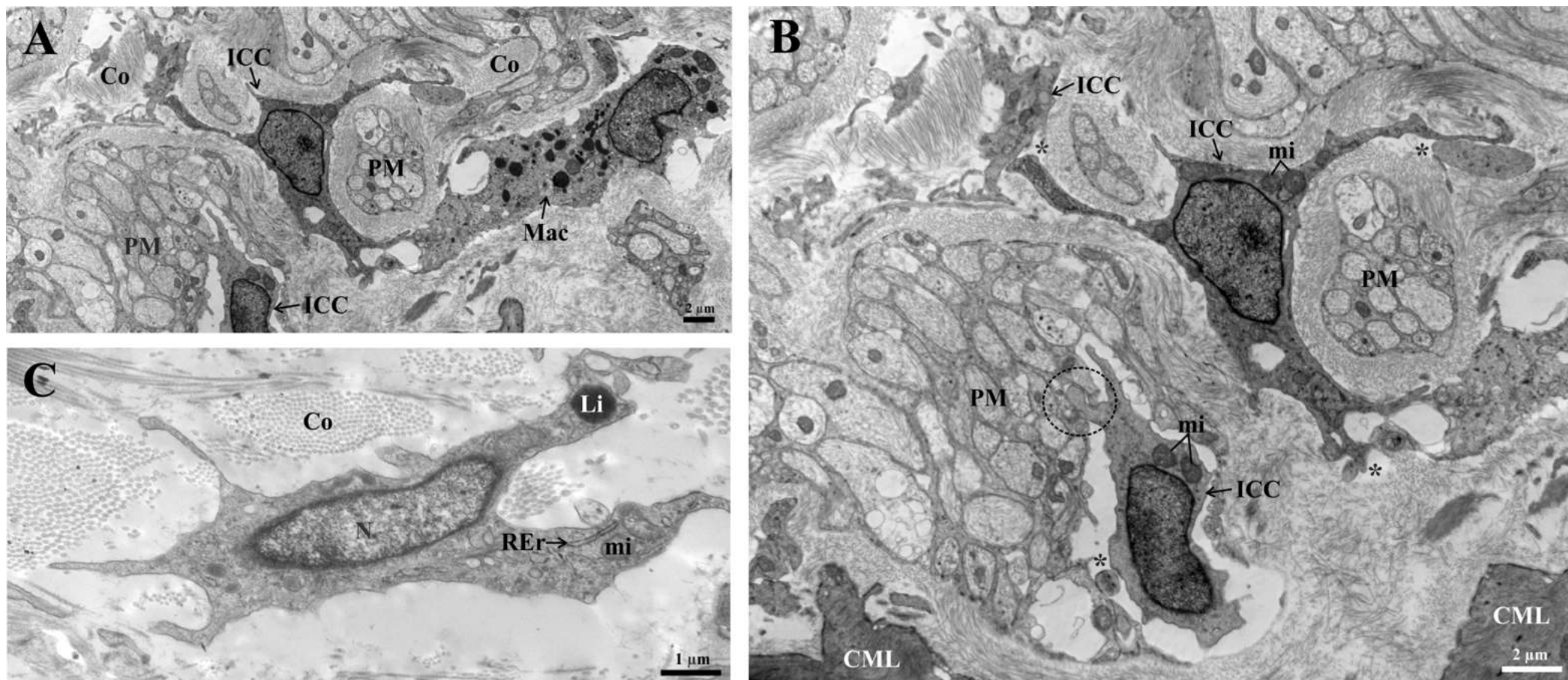


Fig 22. Microfotografías electrónicas de transmisión del colon ascendente de *L. maximus*. (A) Características ultraestructurales de dos células intersticiales de Cajal (ICC) localizadas en la región próxima al plexo mientérico. (B) Detalle de la figura A donde se observan ICC multipolares con abundantes mitocondrias que se caracterizan por presentar contactos cercanos con otras ICC (asteriscos) y terminales nerviosas (línea de puntos). (C) Características ultraestructurales de un fibroblasto. CML, célula muscular lisa; Co, fibras de colágeno; ICC, célula intersticial de Cajal; Li, lisosoma; Mac, macrófago; mi, mitocondria; N, núcleo; PM, plexo mientérico; REr, retículo endoplasmático rugoso.



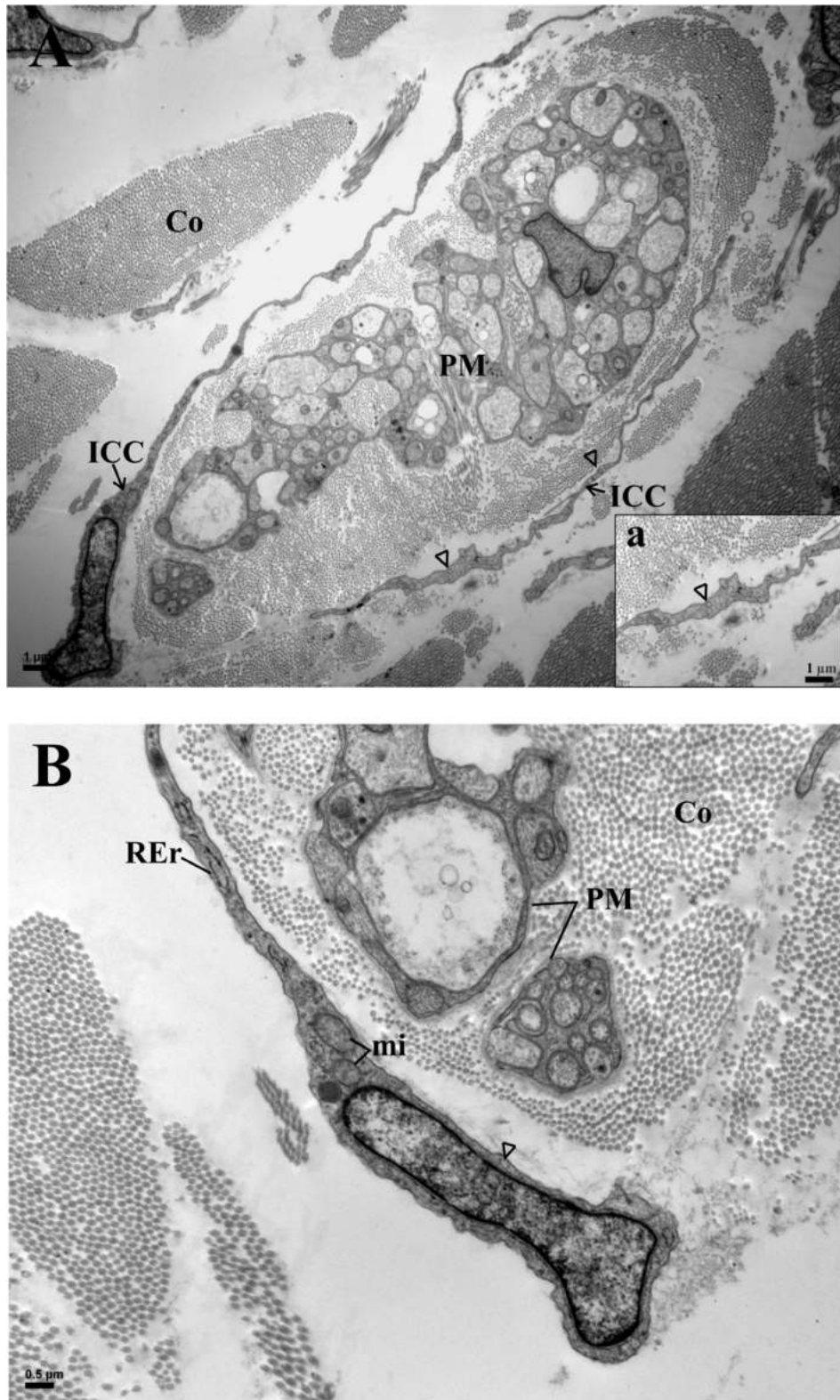


Fig 23. Microfotografías electrónicas de transmisión del colon descendente de *L. maximus*. (A) Características ultraestructurales de dos células intersticiales de Cajal (ICC) ubicadas alrededor del plexo mientérico. a. Mayor magnificación de una ICC donde se observan pequeñas caveolas. (B) Detalle de una ICC donde pueden observarse mitocondrias, cisternas del retículo endoplasmático rugoso y caveolas. Cabeza de flecha, caveolas; Co, fibras de colágeno; ICC, células intersticiales de Cajal; mi, mitocondria; PM, plexo mientérico; REr, retículo endoplasmático rugoso.

### 2.3 Estudio histoquímico

En el ciego, el glicocálix presentó glicoconjugados (GCs) ácidos, tanto carboxilados como sulfatados (Fig. 24B). Las células caliciformes de esta primera porción del intestino grueso presentaron tres perfiles histoquímicos diferentes con la secuencia AB pH 2,8/PAS, por lo que se identificaron células de secreción neutra, ácida y mixta (Fig. 24A-D). La técnica AT a ambos valores de pH reveló la existencia de células caliciformes metacromáticas a lo largo de todo el eje de la cripta (Fig. 24E). También se identificaron sialomucinas en este tipo celular (Fig. 24F) (Tabla 8).

El análisis de GCs permitió evidenciar diferencias relevantes entre el patrón de glicosilación de las células caliciformes que se encuentran dentro y fuera del surco colónico a lo largo de todo el colon ascendente (Tabla 9). El cambio en el perfil histoquímico de este tipo celular se produjo, en la mayoría de las técnicas, a la altura de las crestas colónicas. En todos los ejemplares estudiados, la mucosa que reviste el lado colónico luminal de la cresta (colonic luminal side, CLS) presentó un patrón de glicosilación diferente al lateral de la cresta que limita con el surco (GS, groove side) (Fig. 25).

El método AB pH 2,8/PAS permitió identificar células caliciformes de secreción neutra, ácida y mixta tanto en el surco como en el lumen principal del órgano (Fig. 25A-D). Sin embargo, el patrón de distribución de estas glándulas unicelulares difirió notablemente entre ambos sectores (Fig. 25C, D). Las células caliciformes que se encuentran fuera del surco presentaron un gradiente decreciente de GCs neutros desde la región superior hasta la región inferior de las criptas, identificándose células PAS y AB/PAS positivas en el tercio superior de las glándulas. Las células caliciformes de la zona basal mostraron un patrón histoquímico diferente al del resto de las células, dado que presentaron principalmente GCs carboxilados (Fig. 25C). En el surco, en cambio, se identificaron los tres tipos celulares pero distribuidos a lo largo de todo el eje de la glándula intestinal (Fig. 25D).

A diferencia de la mucosa que reviste el lumen principal del colon, el surco se caracterizó por secretar una alta proporción de sulfomucinas y GCs con complejos polianiónicos (Figs. 25E, F; 26A). Si bien las células caliciformes del lumen principal también mostraron metacromasia con AT, tanto a pH 5,6 como a pH 4,2, esta reacción se observó sólo en las células de la región superior y media de las glándulas de Lieberkühn (Fig. 26B).

Con la técnica KOH/PA\*S las células caliciformes de ambas regiones presentaron una tinción moderada, esto demuestra la presencia de GCs con residuos de ácido siálico (Fig. 26C-E). Sin embargo, el método PA/Bh/KOH/PAS mostró un cambio abrupto en el perfil histoquímico de estas células, las cuales presentaron una reacción negativa en el surco y una reacción fuertemente positiva en el resto de la mucosa colónica. Estos resultados demostraron que sólo las células caliciformes del lumen principal secretan GCs con residuos de ácido siálico O-acil sustituido en C7, C8 o C9 (Fig. 26F, G).

Las células caliciformes del colon descendente secretaron principalmente GCs carboxilados. Si bien se identificaron células de secreción neutra, las mucinas de la mayoría de las células caliciformes poseen un componente ácido (AB positivas) (Fig. 27A-C, H). El método AT a ambos valores de pH reveló la existencia de células caliciformes metacromáticas a lo largo de todo el eje de la glándula intestinal (Fig. 27D, E). El patrón de glicosilación de esta región anatómica presentó escasos residuos de ácido siálico (Fig. 27F, G) (Tabla 10).

El patrón de glicosilación del recto fue similar al colon descendente (Fig. 28A-E). La única diferencia residió en que las mucinas de la región más distal del intestino presentaron abundantes GCs con residuos de ácido siálico que se caracterizaron por estar levemente O-acetilados (Fig. 28F) (Tabla 11).

El perfil histoquímico de los diferentes órganos del intestino grueso puede ser consultado en las tablas 8-11.





**Tabla 8.** Análisis histoquímico del ciego de *Lagostomus maximus*

Técnicas	Ciego				
	Glicocálix	Enterocitos	Células caliciforme		
			Región apical de las criptas	Región media de las criptas	Región basal de las criptas
PAS	0	0	3	3	3
AB pH 2,8	1	0	2	2	2
AB pH 1,0	1	0	2	2	2
AB pH 0,5	0	0	1	1	1
AB pH 2,8/PAS	1T	1M	3M-3P <sup>a</sup>	3M-3P <sup>a</sup>	3T-3M-3P <sup>a</sup>
AB pH 1,0/PAS	1T	1M	3M-3P <sup>a</sup>	3M-3P <sup>a</sup>	3M-3P <sup>a</sup>
AT pH 5,6	3or	3or	2m	2m	2m
AT pH 4,2	1or	1or	1m	1m	1m
KOH/PA*S	0	0	2	2	2
PA/Bh/KOH/PAS	0	0	2	2	2
KOH/PA*/Bh/PAS	0	0	3	3	3

m, metacromasia; M, magenta; or, ortocromasia; P, púrpura; T, turquesa.

Intensidad de reacción: 0, negativo; 1, leve; 2, moderado; 3, fuerte.

<sup>a</sup> Se identificaron células caliciformes con diferentes perfiles histoquímicos.

**Tabla 9.** Análisis histoquímico del colon ascendente de *Lagostomus maximus*

Técnicas	Colon ascendente							
	Surco colónico				Lumen principal			
	Glicocálix	Células caliciformes			Glicocálix	Células caliciformes		
		Región apical de las criptas	Región media de las criptas	Región basal de las criptas		Región apical de las criptas	Región media de las criptas	Región basal de las criptas
PAS	0	3	3	3	0	3	3	1
AB pH 2,8	0	3	3	3	0	3	3	3
AB pH 1,0	2	3	3	3	1	1	1	1
AB pH 0,5	2	3	3	3	1	1	1	1
AB pH 2,8/PAS	0	3M-3P-3T <sup>a</sup>	3M-3P-3T <sup>a</sup>	3M-3P-3T <sup>a</sup>	0	3M-3P <sup>a</sup>	3P	3T
AB pH 1,0/PAS	1T	3M-3P-3T <sup>a</sup>	3M-3P-3T <sup>a</sup>	3M-3P-3T <sup>a</sup>	1T	2P-2M <sup>a</sup>	2P	1T
AT pH 5,6	0	3m	3m	3m	0	3m	3m	1or
AT pH 4,2	0	3m	3m	3m	0	3m	3m	1or
KOH/PA*S	0	2	2	2	0	2	2	2
PA/Bh/KOH/PAS	0	0	0	0	0	2	2	2
KOH/PA*/Bh/PAS	0	3	3	3	0	3	3	3

m, metacromasia; M, magenta; or, ortocromasia; P, púrpura; T, turquesa.

Intensidad de reacción: 0, negativo; 1, leve; 2, moderado; 3, fuerte.

<sup>a</sup> Se identificaron células caliciformes con diferentes perfiles histoquímicos.

**Tabla 10.** Análisis histoquímico del colon descendente de *Lagostomus maximus*

Técnicas	Colon descendente				
	Glicocáliz	Enterocitos	Células caliciforme		
			Región apical de las criptas	Región media de las criptas	Región basal de las criptas
PAS	0	0	1	1	1
AB pH 2,8	1	0	3	3	3
AB pH 1,0	3	0	3	3	3
AB pH 0,5	0	0	1	1	1
AB pH 2,8/PAS	1T	0	3T-3P-3M <sup>a</sup>	3T-3P-3M <sup>a</sup>	3T-3P-3M <sup>a</sup>
AB pH 1,0/PAS	1T	0	3T-3P-2M <sup>a</sup>	3T-3P-2M <sup>a</sup>	3T-3P-2M <sup>a</sup>
AT pH 5,6	2or	2or	3m	3m	3m
AT pH 4,2	0	0	3m	3m	3m
KOH/PA*S	0	0	2	2	2
PA/Bh/KOH/PAS	0	0	1	1	1
KOH/PA*/Bh/PAS	1	0	3	2	2

m, metacromasia; M, magenta; or, ortocromasia; P, púrpura; T, turquesa.

Intensidad de reacción: 0, negativo; 1, leve; 2, moderado; 3, fuerte.

<sup>a</sup> Se identificaron células caliciformes con diferentes perfiles histoquímicos.

**Tabla 11.** Análisis histoquímico del recto de *Lagostomus maximus*

Técnicas	Recto				
	Glicocáliz	Enterocitos	Células caliciforme		
			Región apical de las criptas	Región media de las criptas	Región basal de las criptas
PAS	0	0	1	1	1
AB pH 2,8	1	0	3	3	3
AB pH 1,0	3	0	3	3	3
AB pH 0,5	0	0	1	1	1
AB pH 2,8/PAS	3T	0	3T-3P-3M <sup>a</sup>	3T-3P-3M <sup>a</sup>	3T-3P-3M <sup>a</sup>
AB pH 1,0/PAS	3T	0	3T-3P-3M <sup>a</sup>	3T-3P-3M <sup>a</sup>	3T-3P-3M <sup>a</sup>
AT pH 5,6	2or	2or	3m	3m	3m
AT pH 4,2	0	0	3m	3m	3m
KOH/PA*S	0	0	2-3	2-3	2-3
PA/Bh/KOH/PAS	0	0	1-2 <sup>a</sup>	1-2 <sup>a</sup>	1-2 <sup>a</sup>
KOH/PA*/Bh/PAS	1	0	3	3	3

m, metacromasia; M, magenta; or, ortocromasia; P, púrpura; T, turquesa.

Intensidad de reacción: 0, negativo; 1, leve; 2, moderado; 3, fuerte.

<sup>a</sup> Se identificaron células caliciformes con diferentes perfiles histoquímicos.

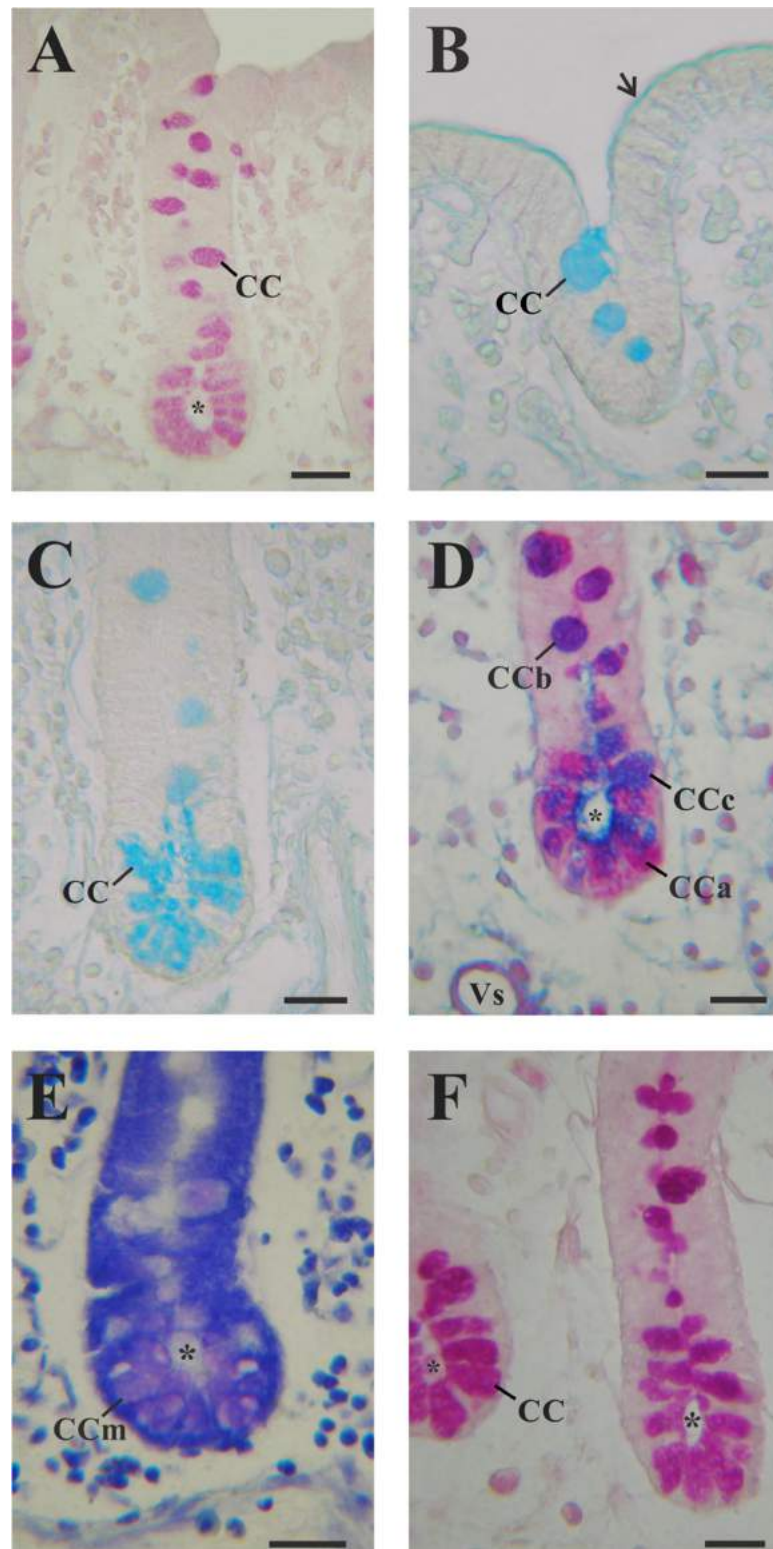


Fig. 24. Patrón de glicosilación del ciego de *L. maximus*. (A) PAS. (B) AB pH 2,8. (C) AB pH 1,0. (D) AB pH 2,8/PAS. (E) AT pH 5,6. (F) PA/Bh/KOH/PAS. CC, célula caliciforme; CCa, célula caliciforme PAS positiva; CCb, célula caliciforme AB/PAS positiva; CCc, célula caliciforme AB positiva; CCm, célula caliciforme con reacción metacromática; CCor, célula caliciforme con reacción ortocromática; vs, vaso sanguíneo; flecha, glicocálix; lumen de la glándula de Lieberkühn (\*). Barra: 20  $\mu$ m.

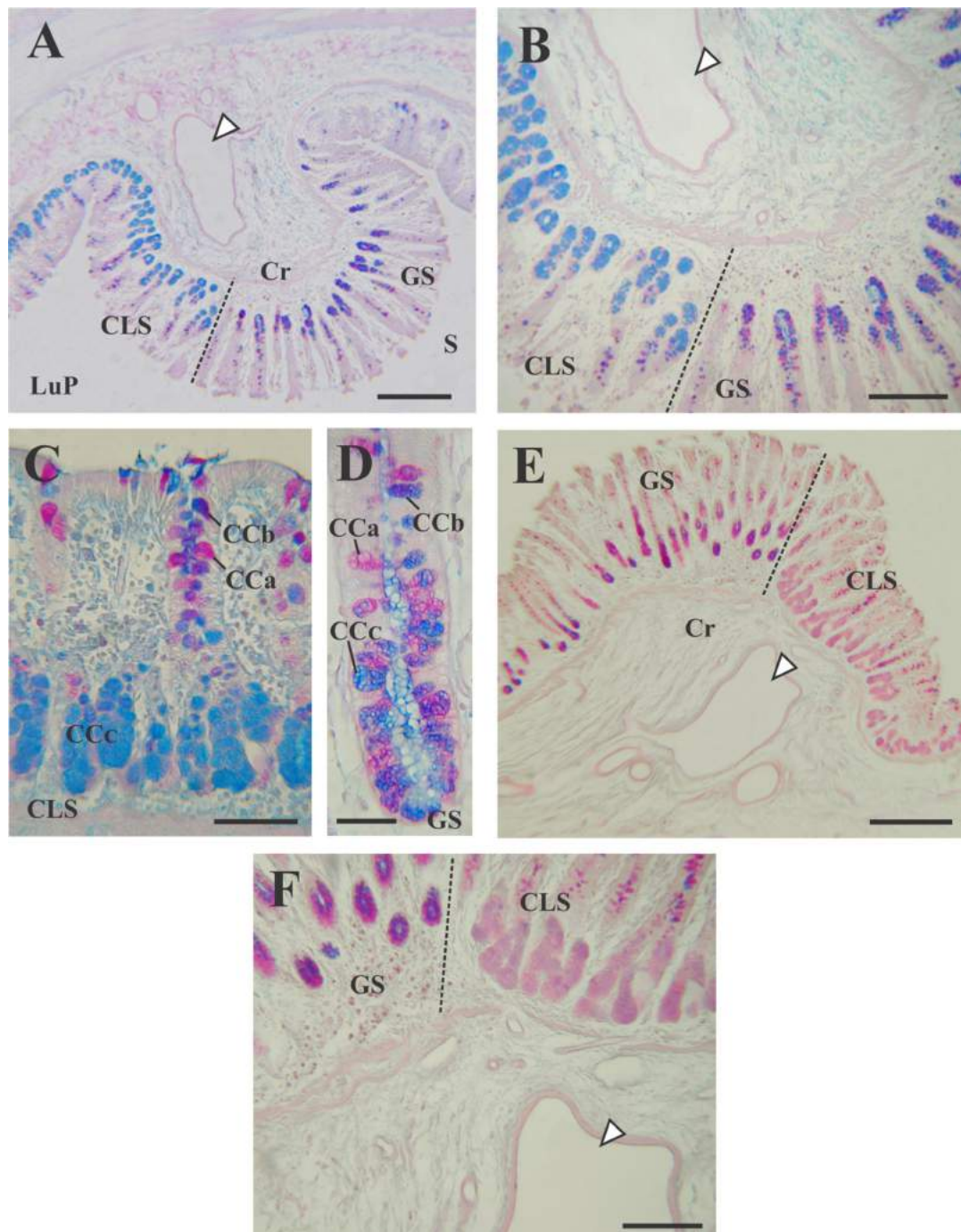


Fig. 25. Caracterización *in situ* del patrón de glicosilación del colon ascendente de *L. maximus*. (A) Microfotografía de una cresta colónica, AB pH 2,8/PAS. (B) Detalle de la figura A donde puede observarse el cambio abrupto en el perfil histoquímico de las células caliciformes (ver línea punteada), AB pH 2,8/PAS. (C) Microfotografía de la mucosa del lateral de la cresta que limita con el lumen principal del colon (CLS), AB pH 2,8/PAS. (D) Microfotografía de una cripta de Lieberkühn presente en el lado de la cresta que limita con el surco colónico (GS), AB pH 2,8/PAS. (E) Cresta no papilar donde se observa un cambio abrupto en el patrón histoquímico de las células caliciformes (ver línea punteada), AB pH 1,0/PAS. (F) Detalle de la figura E, AB pH 1,0/PAS. cabeza de flecha, vena; CLS, borde lateral de la cresta que limita con el lumen principal; ; Cr, cresta; CCa, célula caliciforme PAS positiva; CCb, célula caliciforme AB/PAS positiva; CCc, célula caliciforme AB positiva; GS, borde lateral de la cresta que limita con el surco; LuP, lumen principal; S, surco. Barras: 500  $\mu$ m (A, E); 250  $\mu$ m (B, F); 75  $\mu$ m (C); 50  $\mu$ m (D).



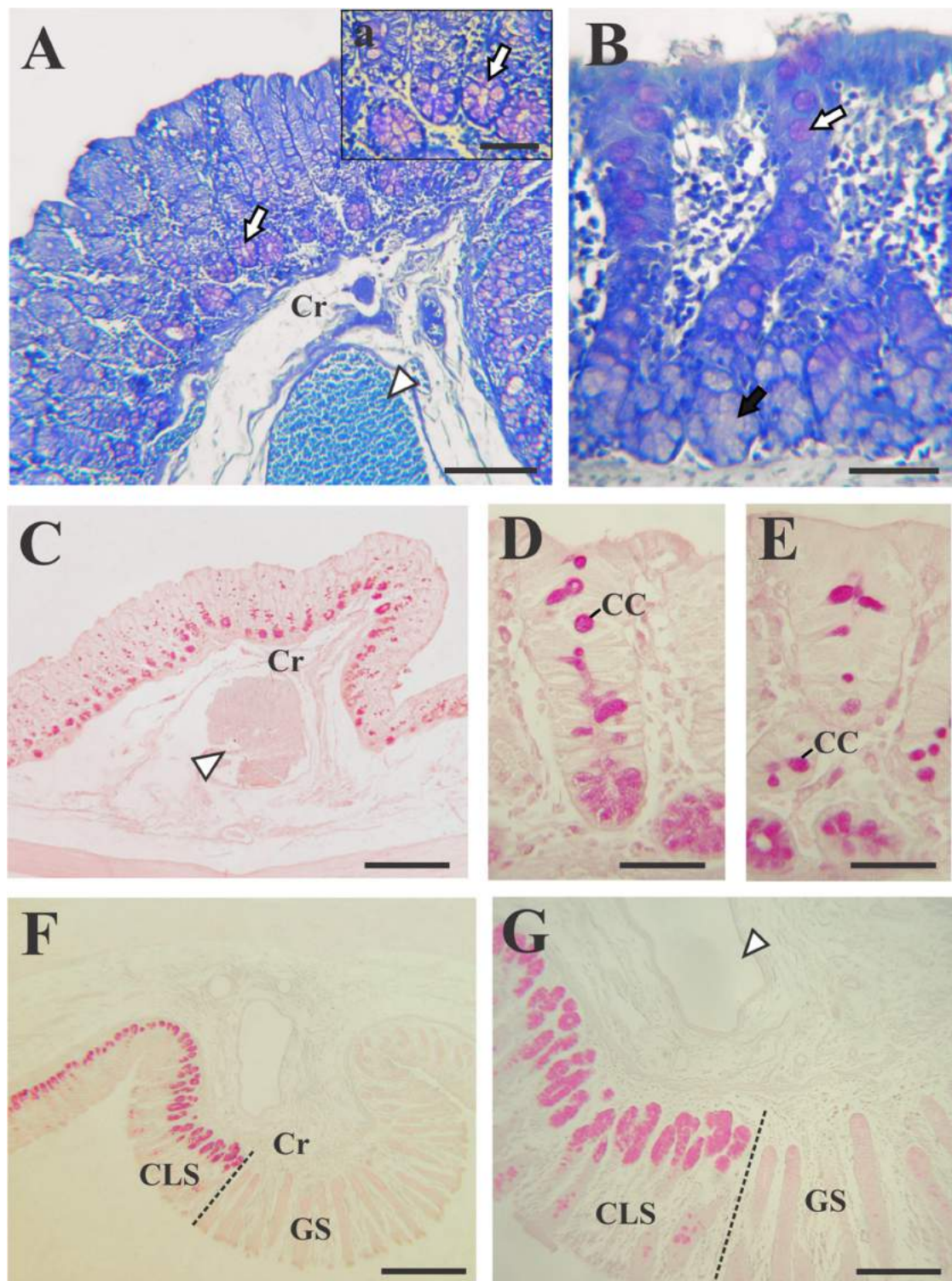


Fig. 26. Caracterización *in situ* del patrón de glicosilación del colon ascendente. (A) Mucosa y submucosa de una cresta colónica, AT pH 5,6. (a) Detalle de las células caliciformes de la región basal de las glándulas de Lieberkühn, AT pH 5,6. (B) Mucosa que reviste el lumen principal del colon, AT pH 5,6. (C) Cresta del surco colónico, KOH/PA\*S. (D) Mucosa que reviste el lumen principal, KOH/PA\*S. (E) Mucosa que reviste al surco colónico, KOH/PA\*S. (F) Microfotografía de una cresta colónica donde se observa un cambio abrupto en el patrón histoquímico de las células caliciformes (ver línea punteada), PA/Bh/KOH/PAS. (G) Detalle de la figura F. cabeza de flecha, vena; CC, células caliciformes; CLS, borde lateral de la cresta que limita con el lumen principal; Cr, cresta; flecha blanca, células caliciformes con reacción metacromática; flecha negra, células caliciformes con reacción ortocromática; GS, borde lateral de la cresta que limita con el surco. Barras: 100  $\mu$ m (A); 50  $\mu$ m (B); 40  $\mu$ m (D, E); 250  $\mu$ m (C, F, G).

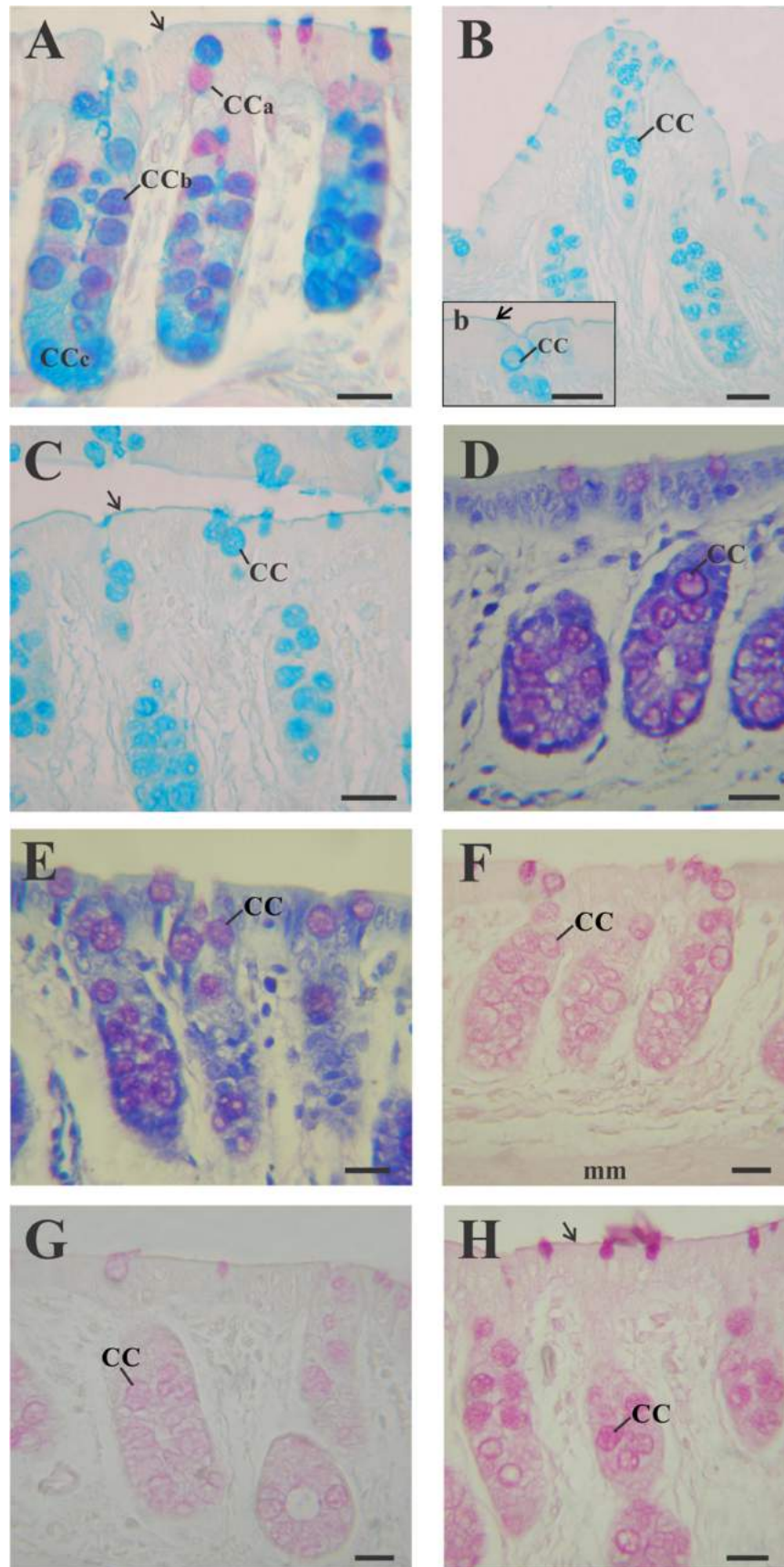


Fig. 27. Patrón de glicosilación del colon descendente. (A) AB pH 2,8/PAS. (B) AB pH 2,8. (C) AB pH 1,0. (D) AT pH 5,6. (E) AT pH 4,2. (F) KOH/PA\*S. (G) PA/Bh/KOH/PAS. (H) KOH/PA\*/Bh/PAS. CC, célula califorme; CCa, célula califorme PAS positiva; CCb, célula califorme AB/PAS positiva; CCc, célula califorme AB positiva; → glicocálix. Barras: 20 (A-H); 15 (b).



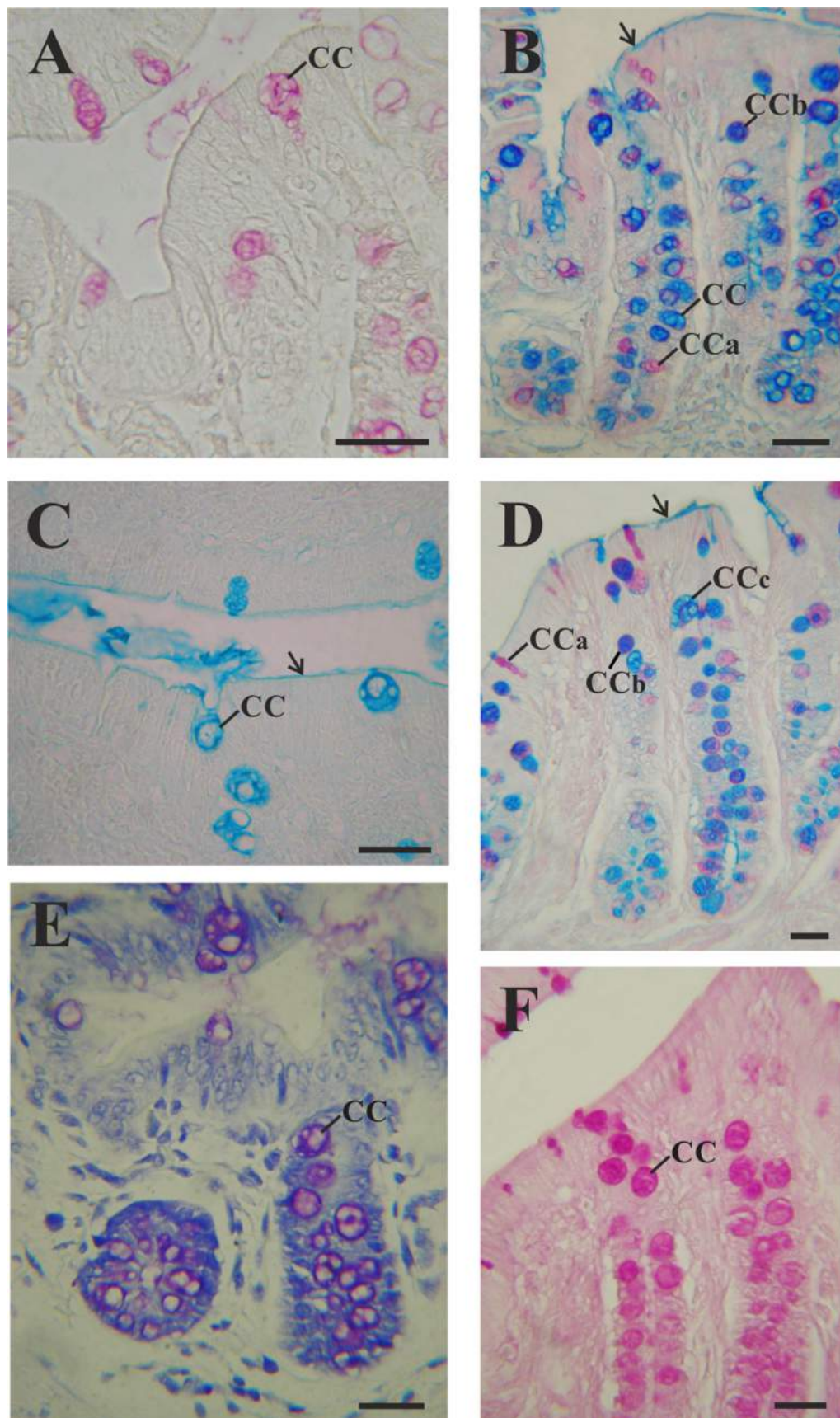


Fig. 28. Patrón de glicosilación del recto. (A) PAS. (B) AB pH 2,8/PAS. (C) AB pH 2,8. (D) AB pH 1,0/PAS. (E) AT pH 5,6. (F) KOH/PA\*S. CC, célula califorme; CCa, célula califorme PAS positiva; CCb, célula califorme AB/PAS positiva; CCc, célula califorme AB positiva; → glicocálix. Barra: 20  $\mu$ m.

## 2.4 Estudio Lectinhistoquímico

El método lectinhistoquímico puso en evidencia diferentes residuos de azúcares específicos en el glicocáliz, enterocitos y células caliciformes del intestino grueso de *L. maximus* (Tabla 12).

En el ciego, las células caliciformes exhibieron marcación sólo con las lectinas WGA, RCA-I y UEA-I, mientras que el glicocáliz reaccionó positivamente con todas las lectinas a excepción de DBA y PNA (Fig. 29).

Las lectinas Con-A, WGA, RCA-I y PNA presentaron el mismo patrón de unión en el surco y lumen principal del colon ascendente. En ambos sectores la marcación fue intensa tanto en el glicocalix como en las células caliciformes (Figs. 30A-D y 31C-F). En cambio, el resto de las lectinas utilizadas demostraron que el surco colónico presenta un perfil lectinhistoquímico diferente al resto del colon ascendente. La marcación con la lectina DBA fue diferente en el surco y en el lumen principal. En el primer caso no se observó positividad, mientras que en el lumen principal la marcación fue intensa tanto en el glicocalix como en las células caliciformes de la región superior y media de las glándulas intestinales (Fig. 30E, F). Si bien la lectina SBA marcó fuertemente el glicocáliz de ambos sectores, sólo presentó afinidad por las células caliciformes que se encuentran fuera del surco (Fig. 31A, B). Por otro lado, UEA-I evidenció residuos de L-fucosa en las células caliciformes de todo el órgano con la excepción de aquellas células que se encontraron en la base de las glándulas intestinales del lumen principal (Fig. 31G, H).

El colon descendente y el recto exhibieron un perfil lectinhistoquímico similar. Las células caliciformes presentaron reacción positiva únicamente con las lectinas WGA, DBA y RCA-I. El glicocáliz del colon descendente presentó afinidad por todas las

lectinas menos por PNA y UEA-I, mientras que en el recto sólo reaccionó con Con-A, WGA y RCA-I (Fig. 32).

**Tabla 12.** Análisis lectinhistoquímico del intestino grueso de *L. maximus*

Lectina		Ciego	Colon ascendente		Colon descendente	Recto
			Lumen principal	Surco colónico		
Con-A	<i>Glicocálix</i>	3	2	2	1	2
	<i>Enterocitos</i>	0	1	1	1	1
	<i>Células caliciformes</i>	0	2	2	0	0
WGA	<i>Glicocálix</i>	3	3	3	3	3
	<i>Enterocitos</i>	0	1	1	3 <sup>c</sup>	3 <sup>c</sup>
	<i>Células caliciformes</i>	2	2	2	3	3
DBA	<i>Glicocálix</i>	0	3	0	3	0
	<i>Enterocitos</i>	0	0	0	3 <sup>c</sup>	3 <sup>c</sup>
	<i>Células caliciformes</i>	0	3 <sup>a</sup>	0	0-3 <sup>b</sup>	0-1 <sup>b</sup>
SBA	<i>Glicocálix</i>	3	3	3	2	0
	<i>Enterocitos</i>	0	1	0	0	0
	<i>Células caliciformes</i>	0	3	0	0	0
RCA-I	<i>Glicocálix</i>	3	3	3	3	3
	<i>Enterocitos</i>	0	1	1	1	0
	<i>Células caliciformes</i>	1	2	2	2	1
PNA	<i>Glicocálix</i>	0	3	3	0	0
	<i>Enterocitos</i>	0	0	0	0	0
	<i>Células caliciformes</i>	0	2	2	0	0
UEA-I	<i>Glicocálix</i>	3	1	1	0	0
	<i>Enterocitos</i>	0	0	0	0	0
	<i>Células caliciformes</i>	0-2	2 <sup>a</sup>	2	0	0

Intensidad de reacción: 0, negativo; 1, leve; 2, moderado; 3, fuerte.

a Sólo las células de la región superior y media de las glándulas de Lieberkühn presentaron reacción positiva.

b Se detectaron células con dos perfiles lectinhistoquímicos diferentes.

c Sólo se observó marcación en la región supranuclear de los enterocitos.

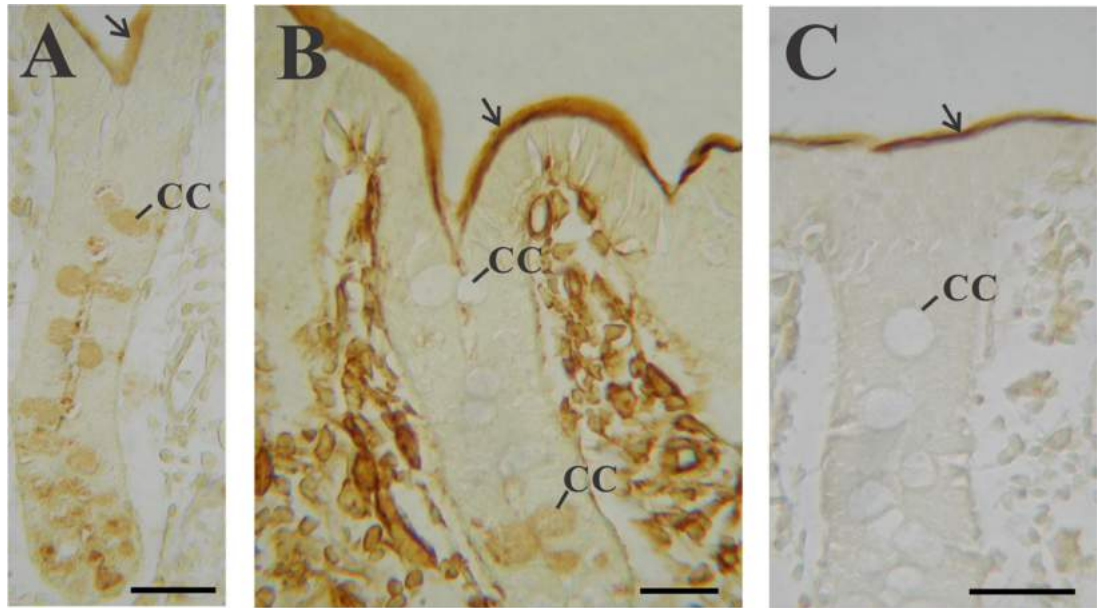


Fig. 29. Caracterización lectinhistoquímica del ciego de *L. maximus*. (A) WGA. (B) UEA-I. (C) SBA. CC, célula caliciforme; → glicocáliz. Barra: 20  $\mu$ m.



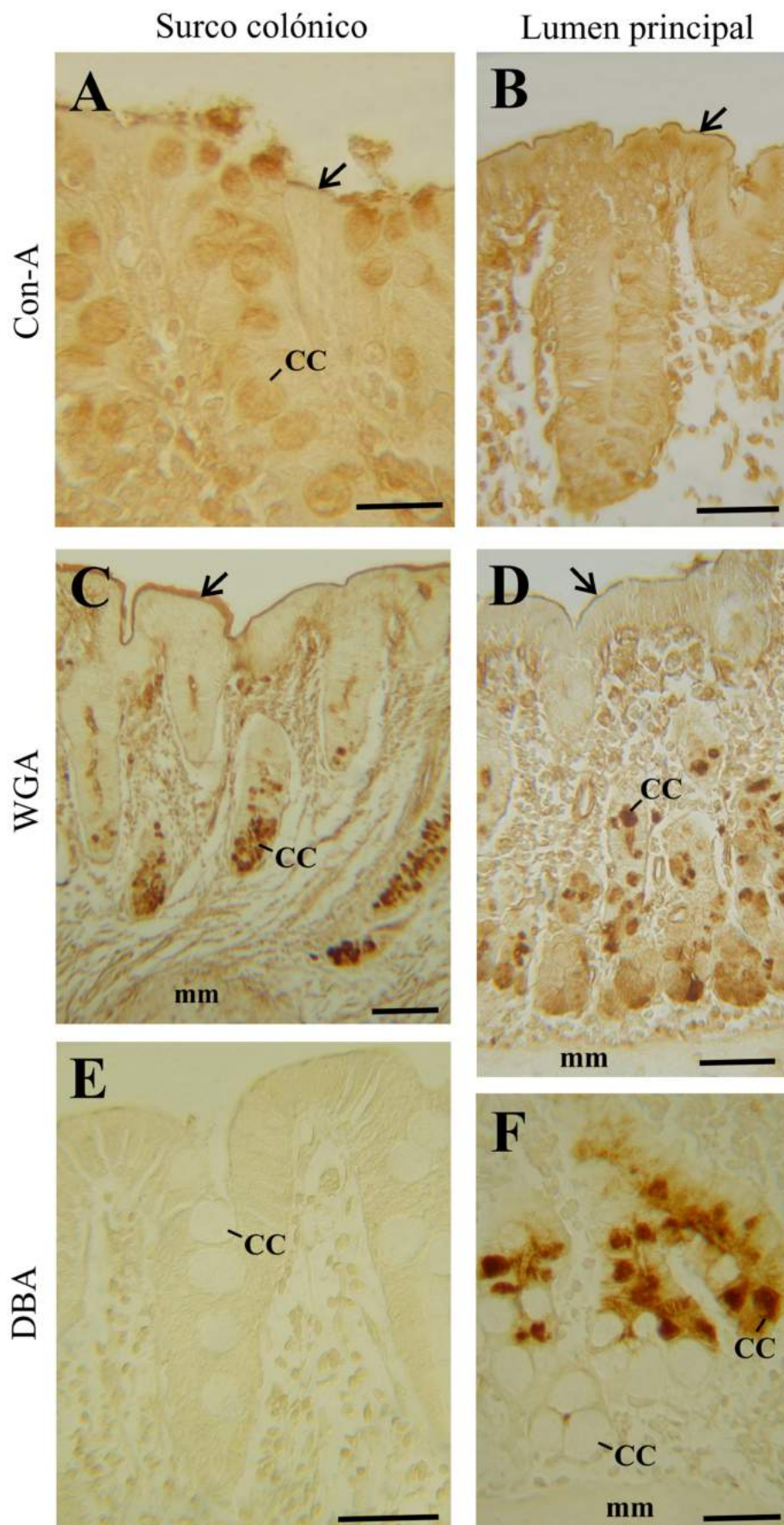


Fig. 30. Lectin histochemistry of the longitudinal colonic sulcus (A, C, E) and of the wall of the ascending colon covering the main lumen (B, D, F). (A, B) Con-A. (C, D) WGA. (E, F) DBA. CC, caliciform cell; mm, mucosal muscle;  $\rightarrow$  glycocalyx. Bars: 20  $\mu$ m (A); 30  $\mu$ m (B); 60  $\mu$ m (C); 40  $\mu$ m (D-F).

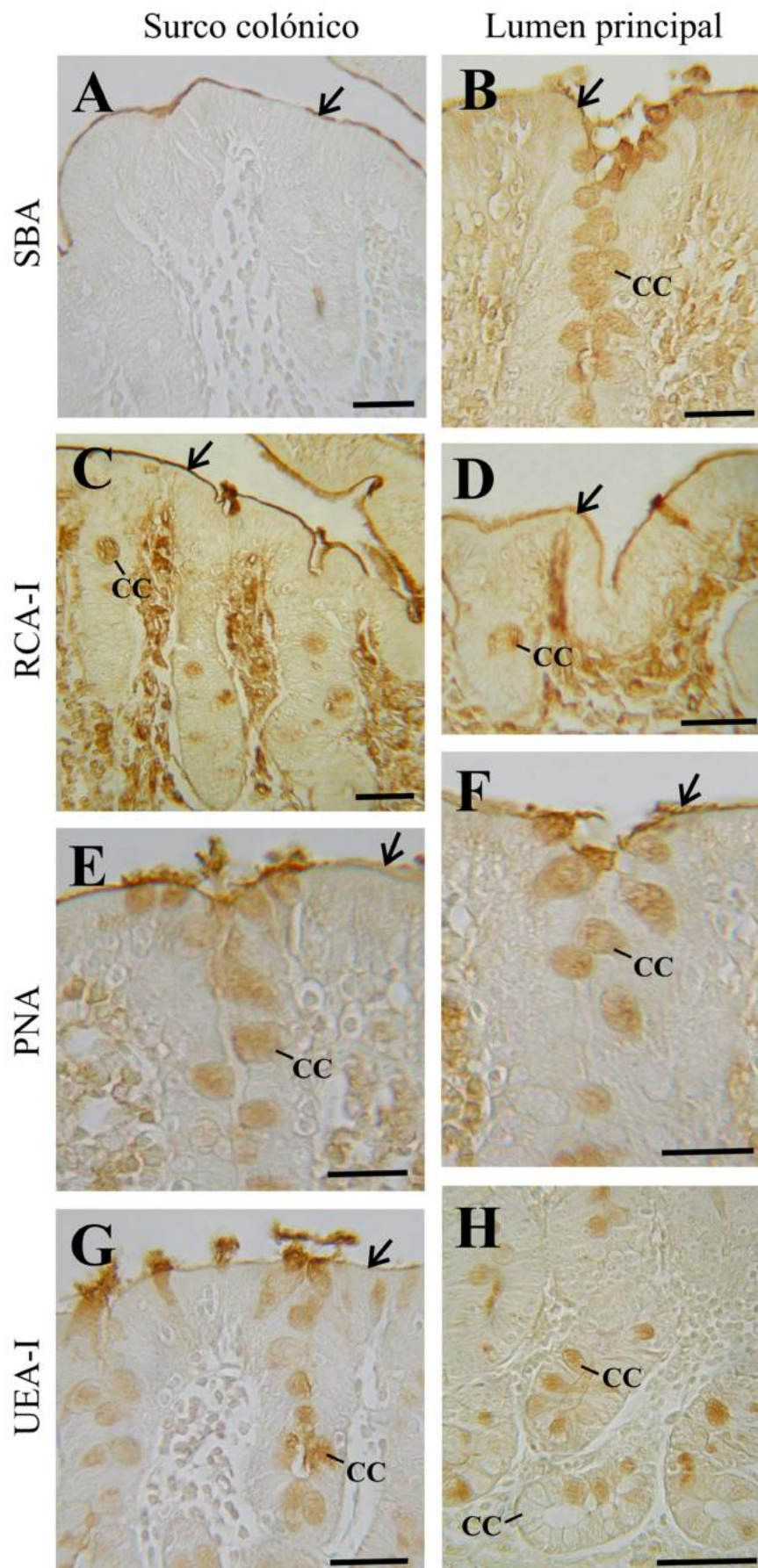


Fig. 31. Caracterización lectinhistoquímica del surco colónico longitudinal (A, C, E, G) y de la pared del colon ascendente que recubre al lumen principal (B, D, F, H). (A, B) SBA. (C, D) RCA-I. (E, F) PNA. (G, H) UEA-I. CC, célula caliciforme; → glicocáliz. Barras: 30  $\mu$ m (A-C); 25  $\mu$ m (D-G); 50  $\mu$ m (H).



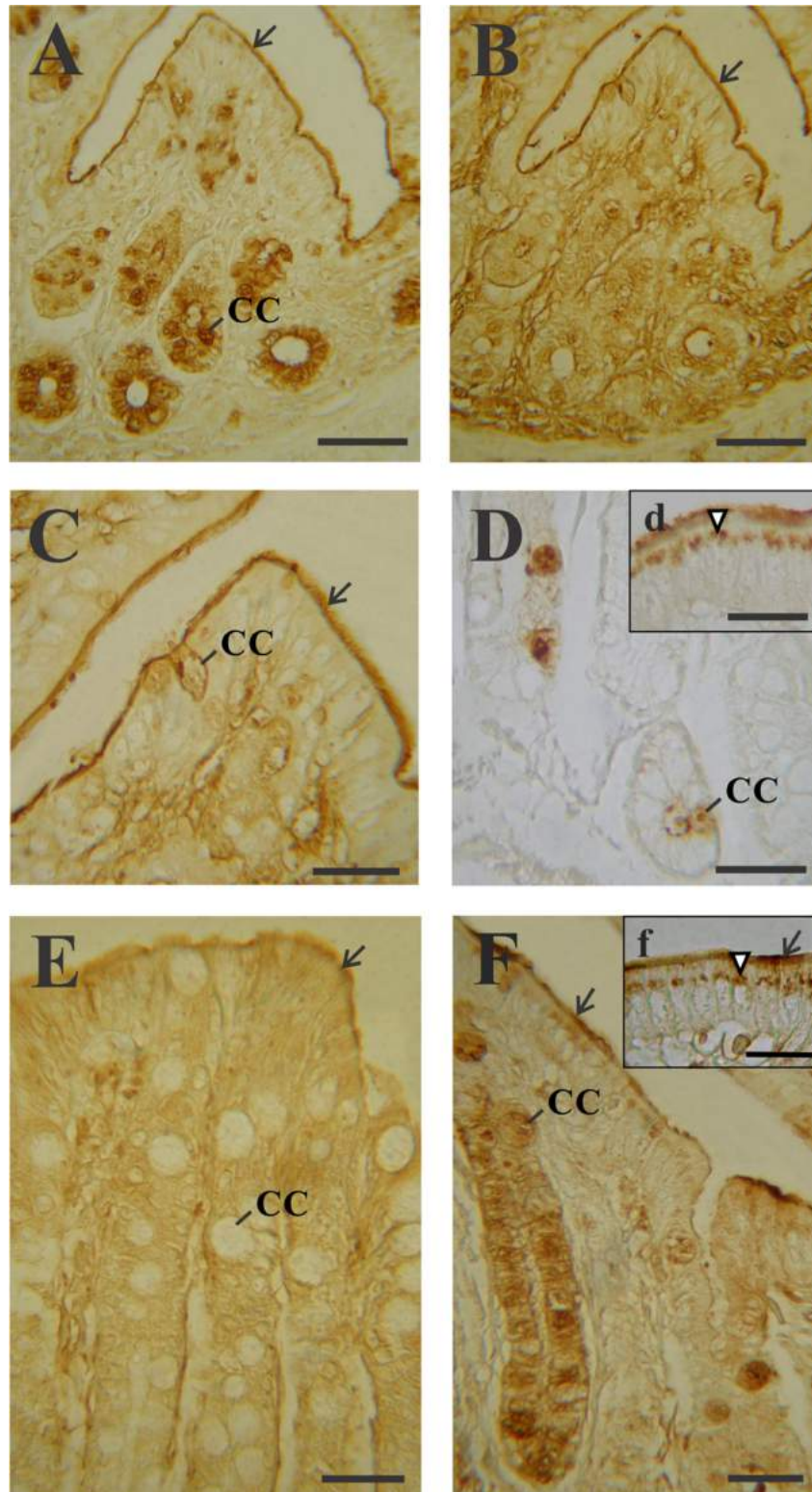


Fig. 32. Caracterización lectinhistoquímica del colon descendente (A-D) y recto (E y F) de *L. maximus*. (A) WGA. (B, C) RCA-I. (D, d) DBA. (E) Con-A. (F, f) WGA. CC, célula caliciforme; → glicocálix; cabeza de flecha, gránulos supranucleares. Barras: 20 (A, B, D); 40 (C, d, E, F).



## 2.5 Estudio inmunohistoquímico y lectinhistoquímico de las ICC

Por el método inmunohistoquímico se evidenciaron diferentes poblaciones de ICC en el intestino grueso de *L. maximus* (Fig. 33). En el ciego se identificaron células c-kit positivas en la región del plexo mientérico y, también se observaron prolongaciones celulares entre las fibras musculares lisas de la túnica muscular (Fig. 34A).

La pared del colon ascendente que recubre el lumen principal presentó células inmunomarcadas en la región del plexo mientérico y en todo el espesor de la capa circular interna y longitudinal externa (Fig. 34B-D). Por su ubicación y morfología estas subpoblaciones celulares se clasificaron como ICC- mientéricas (ICC-MP) e ICC-intramusculares (ICC-IM), respectivamente. Las ICC-MP presentaron una morfología multipolar (Fig. 34B), mientras que las ICC-IM presentaron un cuerpo fusiforme con procesos ramificados y fueron más abundantes en la capa longitudinal (Fig. 34C, D).

En el surco colónico, en cambio, se identificaron ICC-IM pero sólo en la capa circular interna dado que esta región del colon ascendente no presenta una capa longitudinal. Estas células se caracterizaron por ser fusiformes con procesos poco ramificados que se orientan según la dirección del eje mayor de las fibras musculares. Además, se detectaron numerosas células c-kit positivas en la región de la submucosa que limita con la túnica muscular, denominadas ICC del borde submucoso (ICC-SM) (Fig. 35). Esta subpoblación de ICC se extendió de cresta a cresta, formando una banda continua de células multipolares con prolongaciones delgadas, largas e interdigitadas (Fig. 36).

En el colon descendente las células c-kit positivas se observaron en la región próxima a las células ganglionares del plexo mientérico. También se detectaron numerosas células inmunomarcadas en la capa longitudinal de la túnica muscular (Fig. 37A, B).

El recto presentó el mismo patrón inmunohistoquímico que el ciego, se identificaron células c-kit positivas en la región del plexo mientérico y en ambas capas de la túnica muscular. En los plexos se identificaron abundantes células con prolongaciones interdigitadas muy próximas a las células ganglionares (Fig. 37C).

Las dimensiones, obtenidas por técnicas morfométricas, de las células inmunomarcadas en las diferentes regiones anatómicas del intestino grueso pueden ser consultadas en la Tabla 13. A partir del análisis estadístico, se hallaron diferencias significativas entre el ciego y las células c-kit positivas del colon y el recto. De este estudio se desprende que el tamaño de las células inmunomarcadas es mayor en las regiones distales del tracto intestinal (Anexo, Tablas 14-17).

Las diferencias de mayor significación se detectaron entre el surco colónico y el resto de las regiones anatómicas, con excepción del recto. A partir de estos resultados es posible inferir que las células más alargadas (fusiformes) y de mayor tamaño se encuentran en el borde submucoso del surco colónico, mientras que en los sectores restantes las células c-kit positivas de la región del plexo mientérico son de menor tamaño y longitud (Anexo, Tablas 14-17).

Al igual que en el intestino delgado, sólo las lectinas Con-A, WGA y RCA-I marcaron, a lo largo de todo el intestino grueso, regiones de la pared intestinal donde se localizan las ICC. La afinidad de estas tres lectinas estuvo asociada a los plexos mientéricos en todas las regiones anatómicas (Figs. 38). Asimismo, en algunos órganos se detectó marcación por otros subtipos de ICC. En el ciego, la lectina RCA-I marcó levemente algunas células de ambas capas de la túnica muscular (Fig. 38B, b). Por último, en el colon ascendente, se identificaron células positivas en la capa circular interna y longitudinal externa con las lectinas Con-A y WGA, respectivamente (Fig. 38c, D).

**Tabla 13.** Características morfométricas de las células anti c-kit positivas en el intestino grueso de *L. maximus*

Intestino grueso	Área ( $\mu\text{m}^2$ )	Eje mayor ( $\mu\text{m}$ )	Eje menor ( $\mu\text{m}$ )	Perímetro ( $\mu\text{m}$ )
Ciego	$87,41 \pm 13,97$	$16,14 \pm 4,21$	$7,08 \pm 2,16$	$42,8 \pm 10,5$
Colon	$128,02 \pm 12,32$	$18,87 \pm 2,95$	$8,76 \pm 1,84$	$48,06 \pm 6,47$
Surco colónico	$155,60 \pm 13,53$	$24,10 \pm 1,75$	$10,07 \pm 2,65$	$57,35 \pm 5,32$
Recto	$137,89 \pm 5,08$	$23,35 \pm 3,17$	$10,79 \pm 1,68$	$58,19 \pm 6,89$

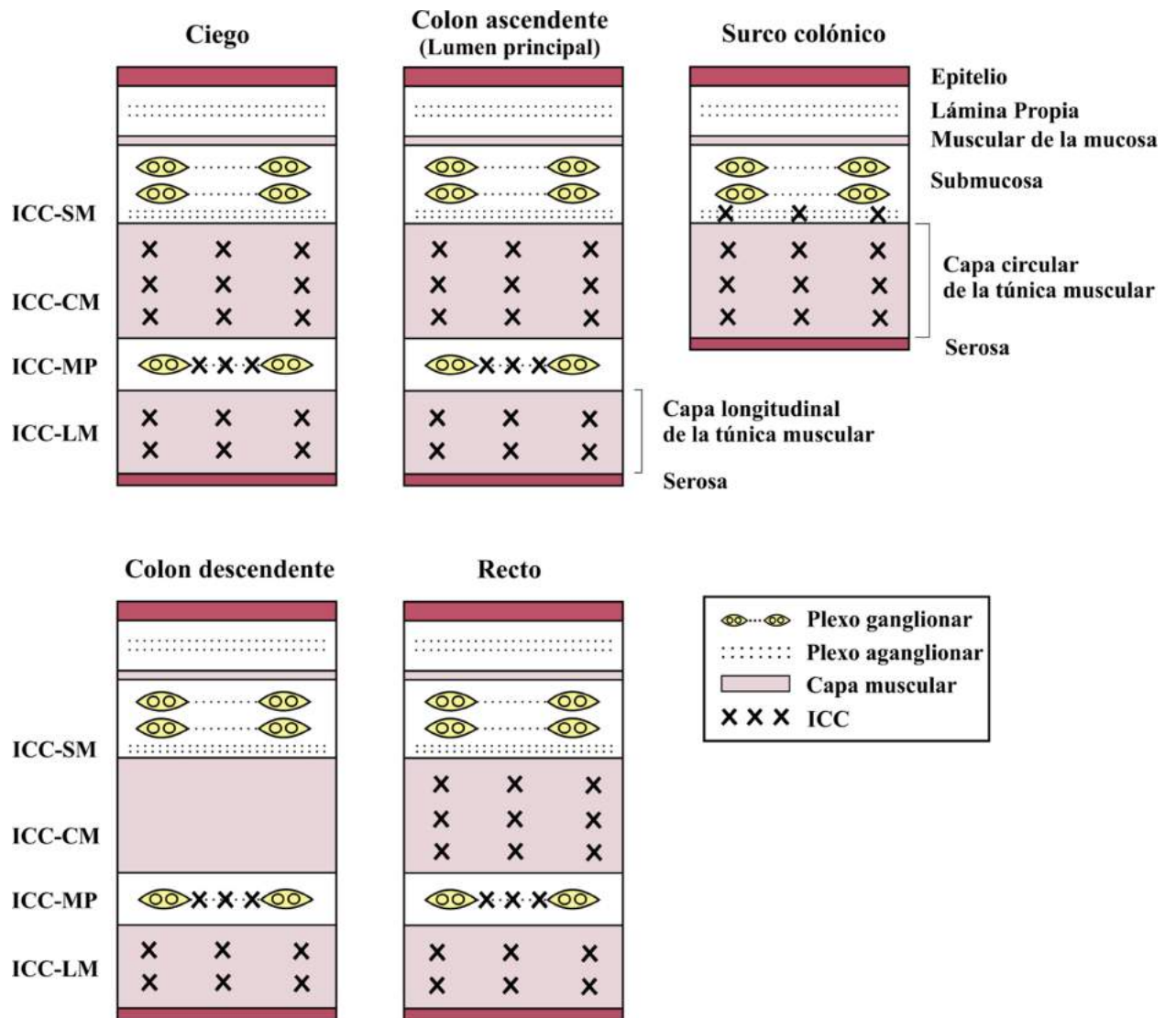


Fig. 33. Localización de células c-kit positivas en el intestino grueso de *L. maximus*. ICC-CM, ICC intramusculares de la capa circular; ICC-MP, ICC del plexo mientérico; ICC-LM, ICC intramusculares de la capa longitudinal; ICC-SM, ICC del borde submucoso.

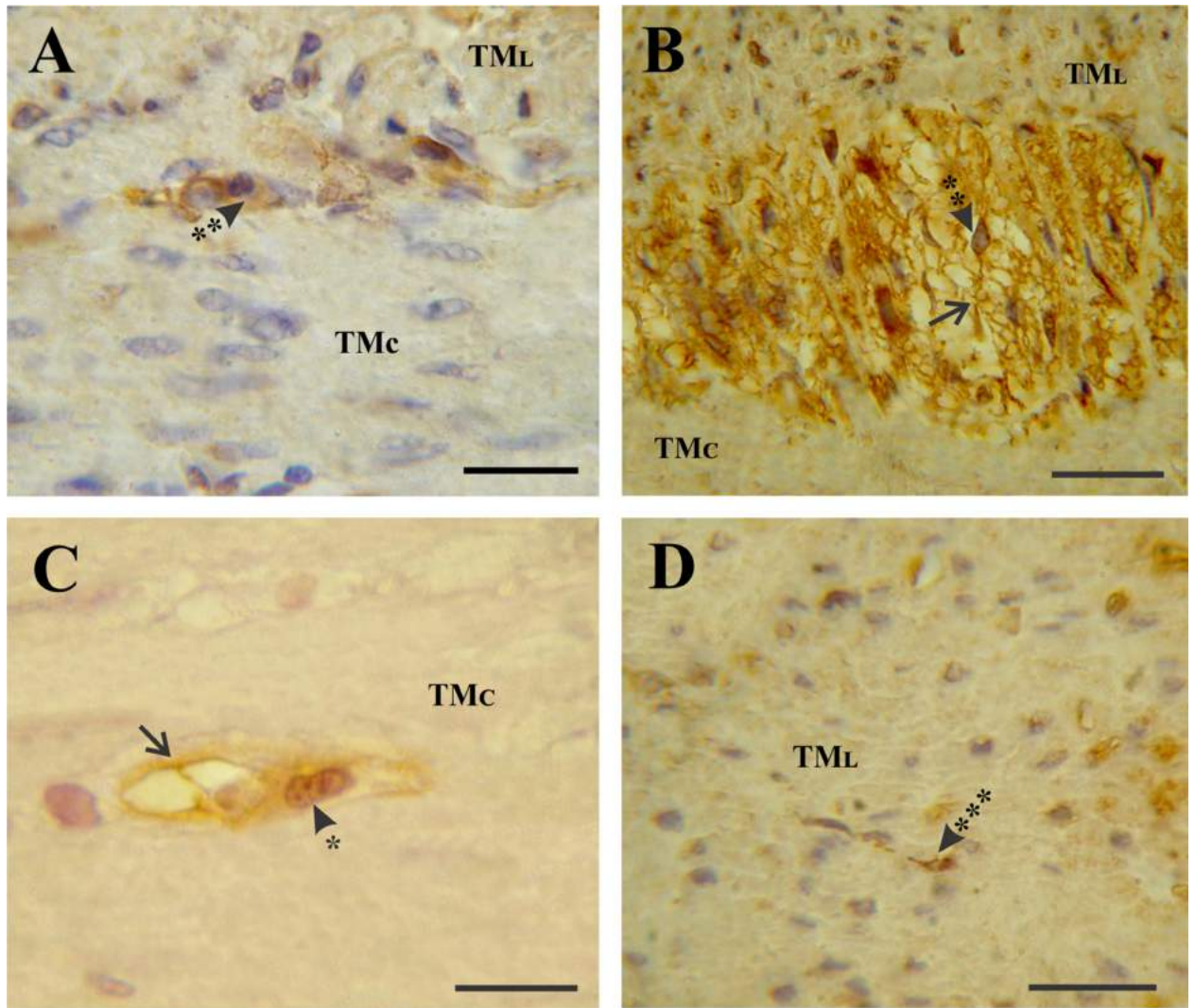


Fig. 34. Inmunohistoquímica anti-c-kit. (A) Ciego. (B-D) Pared del colon ascendente que recubre al lumen principal. ◀\* célula positiva en la capa circular de la túnica muscular. ◀\*\* células positivas en la región del plexo mientérico. ◀\*\*\* células positivas en la capa longitudinal de la túnica muscular. —→ prolongación citoplasmática. TM<sub>C</sub>, capa circular interna de la túnica muscular; TM<sub>L</sub>, capa longitudinal externa de la túnica muscular. Barras: 20  $\mu$ m (A); 30  $\mu$ m (B-D).

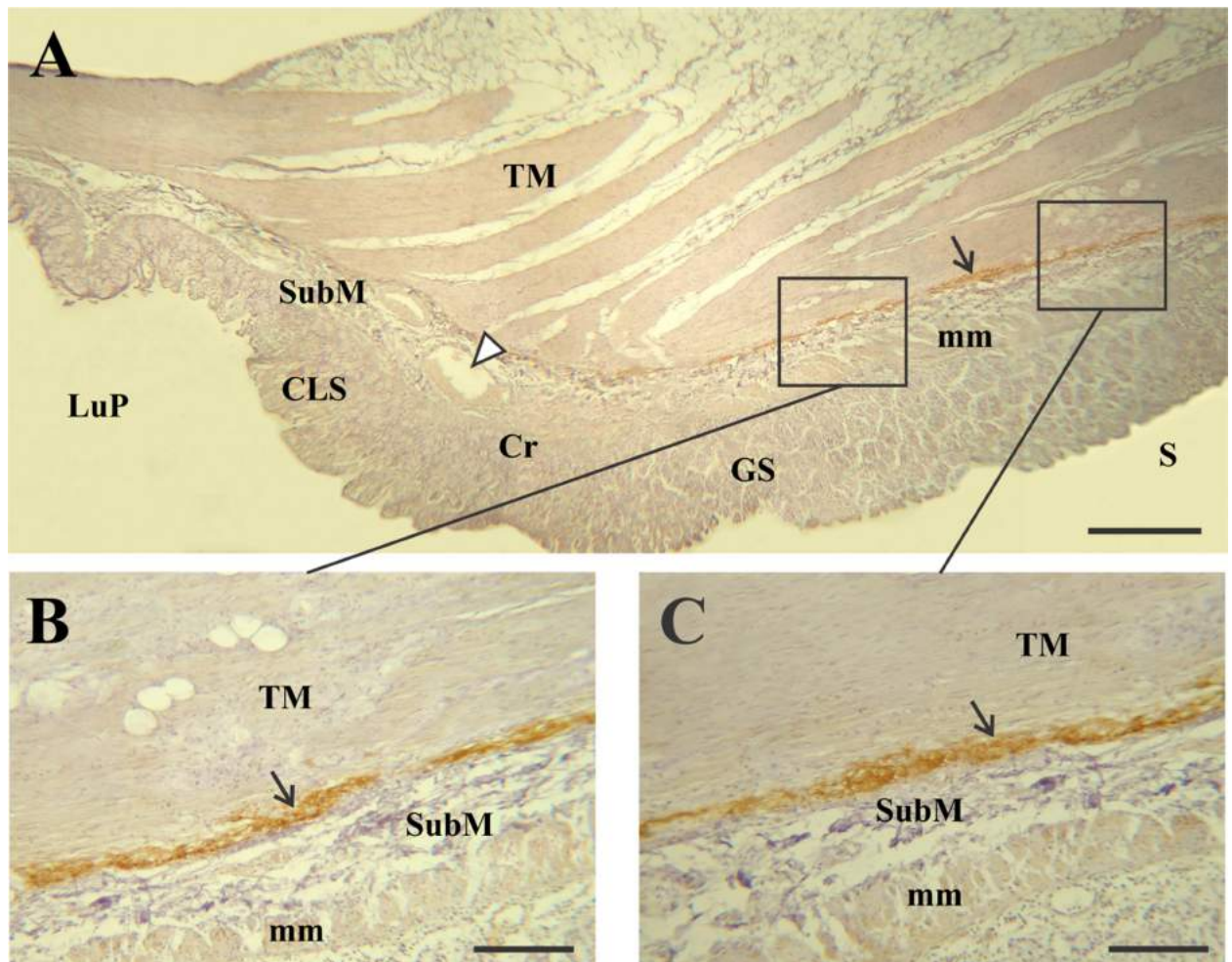


Fig. 35. Inmunohistoquímica anti-c-kit del surco colónico de *L. maximus*. (A) Microfotografía de una cresta donde se observa una banda continua de células c-kit positivas en la región de la submucosa que limita con la túnica muscular. (B, C) Detalle de la túnica submucosa con células c-kit positivas. Cabeza de flecha, vena; CLS, borde lateral de la cresta que limita con el lumen principal; Cr, cresta; flecha, ICC-SM; GS, borde lateral de la cresta que limita con el surco; LuP, lumen principal; mm, muscular de la mucosa; S, surco; SubM, túnica submucosa; TM, túnica muscular. Barras: 500  $\mu$ m (A); 100  $\mu$ m (B, C).



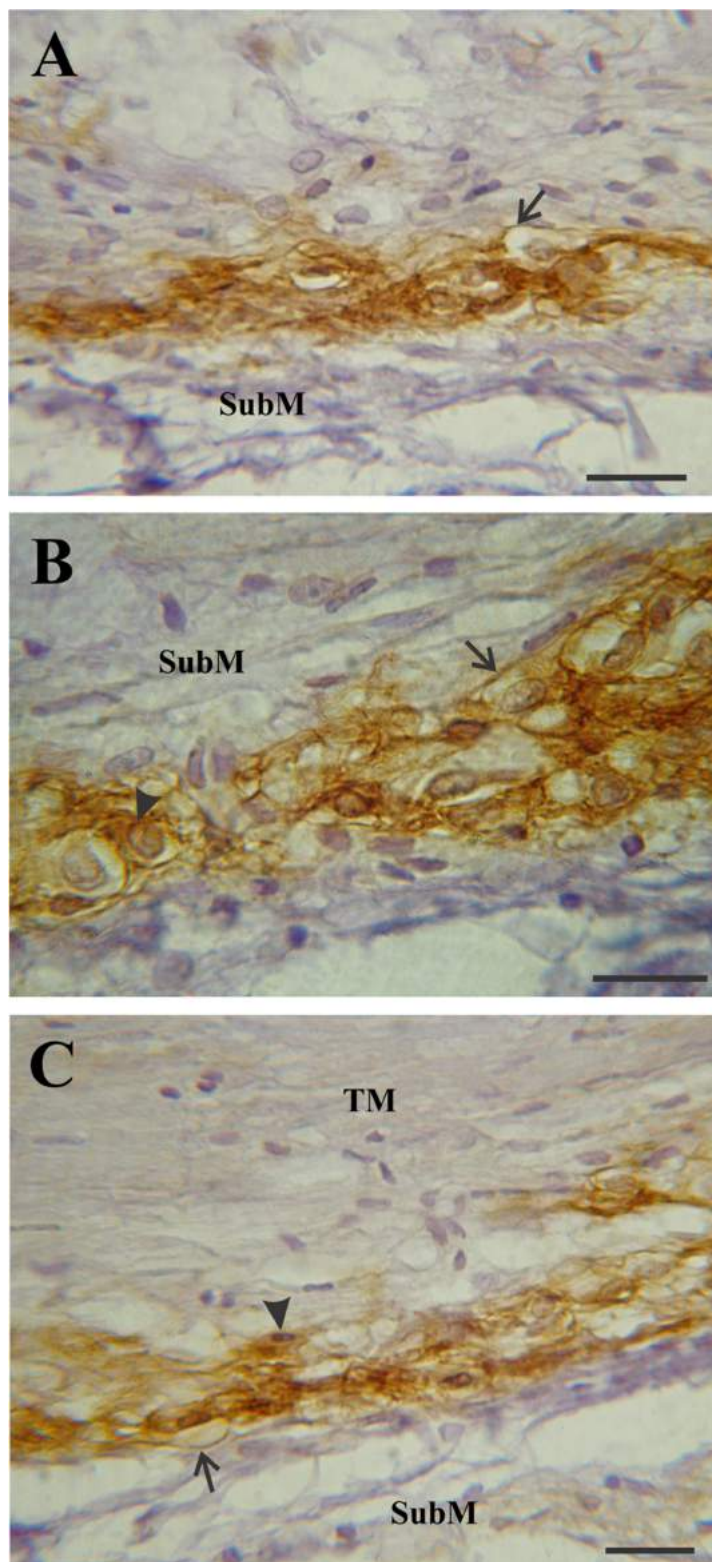


Fig. 36. Células c-kit positivas del borde submucoso. (A-C) Detalle de ICC-SM. Cabeza de flecha, ICC-SM; flecha, prolongación citoplasmática; SubM, túnica submucosa; TM, túnica muscular. Barras: 30  $\mu$ m.

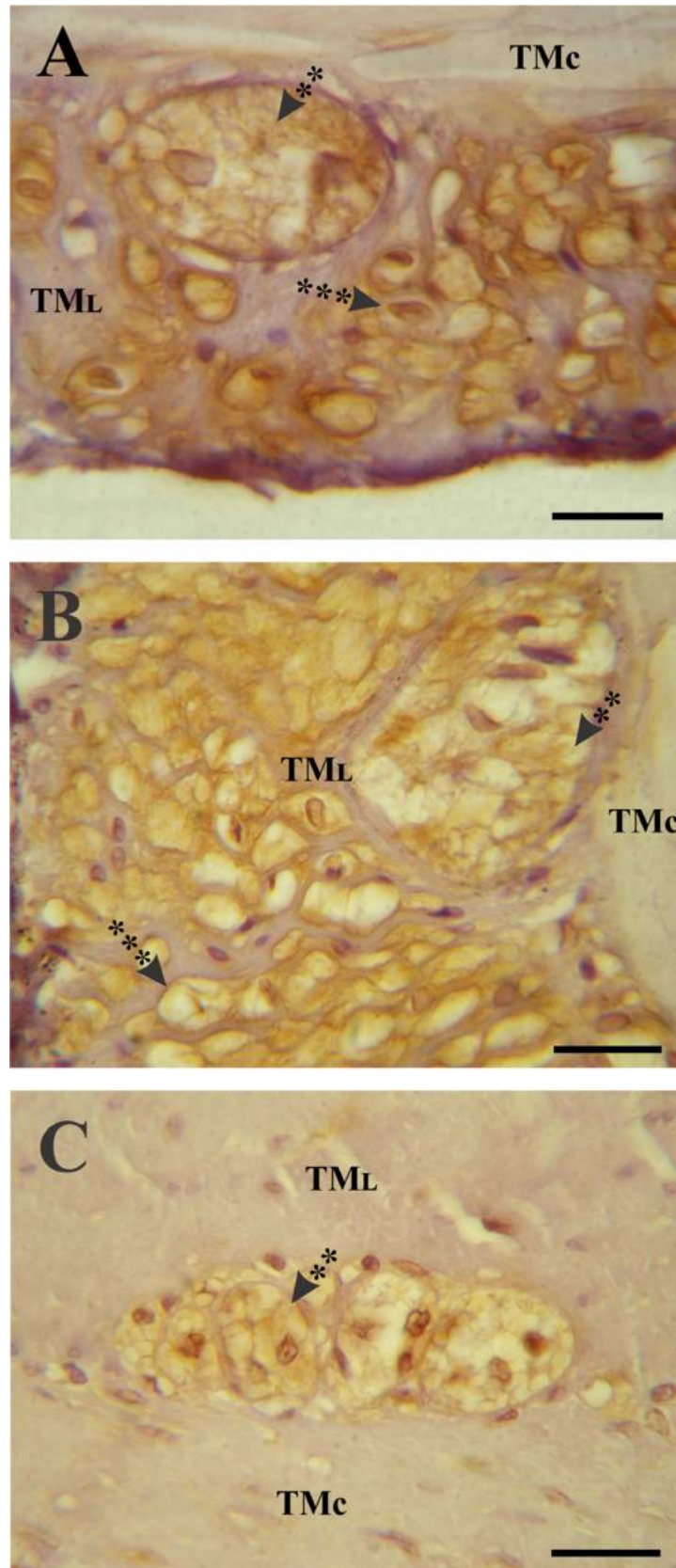


Fig. 37. Inmunohistoquímica anti-c-kit. (A, B) Colon descendente. (C) Recto. ◀\*\* células positivas en la región del plexo mientérico. ◀\*\*\* células positivas en la capa longitudinal de la túnica muscular. TMC, capa circular interna de la túnica muscular; TML, capa longitudinal externa de la túnica muscular. Barras: 15  $\mu$ m (A, B); 20  $\mu$ m (C).



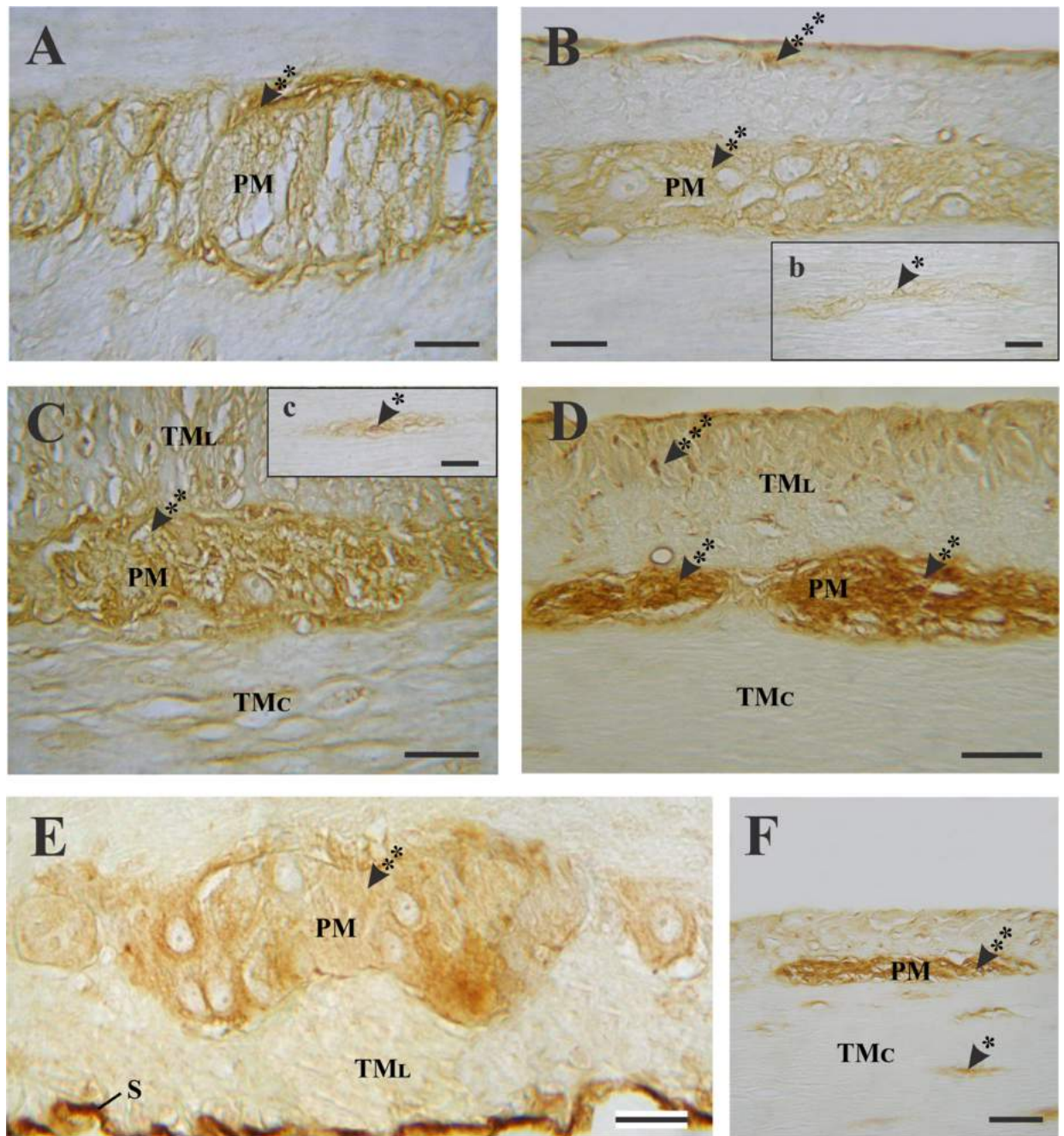


Fig. 38. Caracterización lectinhistoquímica de las ICC del intestino grueso. (A) Con-A, ciego. (B) RCA-I, ciego. (C, c) Con-A, colon ascendente. (D) WGA, colon ascendente. (E) RCA-I, colon descendente. (F) Con-A, recto. ◀\* células positivas en la capa circular de la túnica muscular; ◀\*\* células positivas en la región del plexo mientérico; ◀\*\*\* células positivas en la capa longitudinal de la túnica muscular; PM, plexo mientérico; TMC, capa circular interna de la túnica muscular; TML, capa longitudinal externa de la túnica muscular; S, serosa. Barras: 10  $\mu$ m (A, c, E); 20  $\mu$ m (B, C); 30  $\mu$ m (D); 50  $\mu$ m (F).

## DISCUSIÓN

---

Estudios comparativos en diferentes especies de vertebrados han demostrado que la morfología del tubo digestivo varía significativamente, incluso entre grupos emparentados, al exhibir modificaciones estructurales adaptadas a dietas especializadas (Kardong, 2007). En particular, los roedores presentan diferencias notables en su anatomía intestinal, principalmente en el ciego y colon ascendente (Kotzé et al., 2010). La organización estructural del tracto intestinal en *L. maximus* es similar a la descrita en otros roedores histicognatos, tanto africanos como sudamericanos, al presentar un ciego voluminoso y un surco colónico longitudinal a lo largo del lado mesentérico del colon ascendente. De este modo, la vizcacha de llanura (*L. maximus*) presenta, al igual que otros herbívoros, una especialización intestinal que facilita la fermentación bacteriana.

La morfología y ultraestructura del intestino delgado y grueso han sido estudiadas en diversas especies de mamíferos (Sato et al., 1990; Arellano et al., 2002; Hosoyamada y Sakai, 2007; Zanuzzi et al., 2008; Hansen et al., 2009; Mantani et al., 2014; Vásquez Cachay et al., 2014). En estos estudios se ha demostrado que el epitelio presenta células altamente especializadas lo que se relaciona con las múltiples funciones digestivas, absortivas, endocrinas e inmunológicas que cumple la mucosa intestinal.

En *L. maximus*, las células epiteliales del intestino delgado y grueso exhibieron rasgos estructurales similares a las descritas en otros mamíferos, aunque también presentaron características que fueron particulares de la especie. De esta manera, al igual que en otros vertebrados, los enterocitos exhibieron una marcada polaridad celular, al presentar en la región apical microvellosidades uniformes y en sus superficies laterales complejos de unión y prolongaciones citoplasmáticas interdigitadas. Esto demuestra que, tal como ha sido sugerido por Takashima et al., (2013), las especializaciones de membrana presentes en este tipo celular se encuentran altamente conservadas y están asociadas con los procesos de absorción y transporte.

Además, los complejos de unión permiten que el epitelio regule los movimientos paracelulares de solutos a favor de sus gradientes electroosmóticos (De Lisle, 2014). Estos sitios de adhesión especializados establecen una barrera entre la luz intestinal y el compartimiento intercelular y permiten la retención selectiva de las sustancias absorbidas (Turner, 2009).

Las características ultraestructurales de los dos tipos de enterocitos identificados en el íleon de *L. maximus* – células absorptivas de citoplasma electron-lúcido y electron-denso – han sido descritas en el epitelio intestinal de ciertos peces teleósteos, como *Oncorhynchus mykiss* y *Acipenser ruthenus* (Abaurrea-Equisoah y Ostos-Gamido, 1996; Korneva y Bednyakov, 2011). Si bien en mamíferos no se han encontrado resultados similares a nivel ultraestructural, estudios moleculares han permitido reconocer dos tipos de enterocitos en el intestino delgado de humanos (Gassler et al., 2006). Ambos tipos celulares exhibieron diferentes perfiles de expresión génica y se caracterizaron por presentar diferentes patrones de distribución dentro del eje cripta-vellosidad. Aunque los dos tipos de enterocitos identificados en el presente trabajo no exhibieron una distribución espacial bien definida dentro del epitelio intestinal, nuestros resultados podrían dar apoyo estructural o morfológico a la caracterización molecular que ha sido realizada por Gassler et al. (2006). Por lo expuesto, las diferencias morfológicas encontradas entre ambos tipos celulares podrían ser indicativas de diferentes estados fisiológicos.

Las células de Paneth se ubicaron en la base de las criptas de Lieberkühn de las tres porciones del intestino delgado de *L. maximus*, siendo esta distribución similar a lo encontrado en ratones, ratas, cobayos, equinos y humanos (Satoh et al., 1990; Takehana et al., 1998; Vásquez Cachay et al., 2014). A diferencia de estas especies, las células de Paneth no se han observado en el gato, perro y cerdo (Bloom y Fawcett, 1994; Dellman y Eurell, 1998). En *L. maximus*, este tipo celular presentó similitudes morfológicas con las células de Paneth de otras especies al exhibir forma piramidal y gránulos acidófilos supranucleares (Zanuzzi et al., 2008; Vásquez Cachay et al., 2014). A partir del estudio comparativo de la ultraestructura de las células de Paneth en el

intestino delgado de varios mamíferos, Satoh et al. (1990) han observado que la morfología de este tipo celular varía según la especie, principalmente en relación al tamaño, número y electron-densidad de sus gránulos secretorios. De los animales estudiados, únicamente los cobayos (roedores histrocomorfos, familia Cavidae) exhibieron célula de Paneth con gránulos electron-densos homogéneos. Las especies restantes, entre las que se encuentran roedores miomorfos e histicomorfos, presentaron gránulos de electron-densidad variable. A diferencia de estas características ultraestructurales, en *L. maximus* la mayoría de los gránulos de las células de Paneth exhibieron una matriz homogénea, mientras que otros mostraron una estructura bipartita con un centro electron-denso y una región periférica de menor densidad. Dado que se observaron importantes diferencias en la ultraestructura de los gránulos entre especies que pertenecen a una misma familia, e incluso se identificaron similitudes entre órdenes tan diferentes como primates (Primates), quirópteros (Chiroptera) y roedores (Rodentia), es probable que las características ultraestructurales de las células de Paneth no se correlacionen con la filogenia.

Por otro lado, la estructura bipartita descrita en algunos gránulos de las células de Paneth de *L. maximus* también ha sido descrita en roedores del suborden Myomorpha y en humanos (Satoh et al., 1990). Estudios posteriores de inmunomicroscopía electrónica han demostrado que en estas especies, el halo periférico electron-lúcido contiene oligosacáridos O-ligados con residuos de N-acetilgalactosamina y N-acetilglucosamina, mientras que el núcleo electron-denso presenta oligosacáridos N y O-ligados con residuos de L-fucosa (Leis et al., 1997). A partir de estos resultados citoquímicos y de las similitudes ultraestructurales encontradas entre estas especies y la vizcacha de llanura es posible inferir que la estructura bifásica observada en los gránulos de las células de Paneth de *L. maximus* podría ser consecuencia de un patrón de glicosilación diferencial entre ambas zonas. Por otro lado, los gránulos de células de Paneth de *L. maximus* presentaron, al igual que en la mayoría de las especies estudiadas, residuos de fucosa tanto en el yeyuno como en el íleon (Leis et al., 1997; Zanuzzi et al., 2008). La presencia de

glicanos similares en los gránulos secretorios de células de Paneth de diferentes especies sugiere que el patrón de glicosilación de estos gránulos está altamente conservado incluso entre especies filogenéticamente no emparentadas.

Las mucinas intestinales son sintetizadas y secretadas principalmente por glándulas epiteliales unicelulares, las células caliciformes, por lo que en los últimos años se ha dirigido un interés considerable al estudio de su morfología, función, distribución y patrón de glicosilación (McDole et al., 2012). Al igual que en todos los mamíferos, las células caliciformes de *L. maximus* se distribuyeron a lo largo de todo el epitelio del tracto intestinal, siendo mayor su número en el intestino grueso (Boonzaier et al., 2013a; 2013b; Pawlina, 2015). Su observación al MET permitió confirmar la presencia de una gran acumulación de gránulos de mucinógeno en el citoplasma apical que distiende esta región de la célula. La presencia de abundantes gránulos de mucinógeno, es una característica ultraestructural que actualmente se utiliza como criterio para identificar células en un estadio secretorio maduro (Birchenough et al., 2015). En el intestino grueso de *L. maximus* se caracterizaron, por medio de técnicas histoquímicas y de microscopía electrónica, células caliciformes maduras en el tercio inferior de las glándulas de Lieberkühn. Estas observaciones permiten corroborar que, al igual que en otros vertebrados, las células caliciformes de esta región del intestino de *L. maximus* comienzan a madurar en la región de replicación celular.

Diversos estudios han demostrado que el perfil histoquímico de las células caliciformes varía a lo largo del eje cripta-vellosidad en el intestino delgado de diferentes especies de mamíferos (Galotta et al., 2009; Gouyer et al., 2011). Además, Liquori et al. (2012) han descrito resultados similares al analizar el patrón de glicosilación del colon de ratón. En este trabajo se ha demostrado que la distribución de sialomucinas y sulfomucinas varía a lo largo de la cripta intestinal. En estos estudios se sugiere que los patrones de distribución encontrados en las criptas podrían estar asociados con células caliciformes en diferentes etapas de maduración. A

diferencia de estos resultados, en el presente trabajo no se encontraron diferencias entre el perfil histoquímico de las células caliciformes de las criptas y aquellas localizadas en las vellosidades intestinales. Esto permite inferir que en el intestino delgado de *L. maximus*, como en otras especies de roedores (Boonzaier et al., 2013b), no hay patrones de glicosilación a lo largo del eje cripta-vellosidad que puedan estar asociados con el estado de maduración de las células caliciformes. Sólo en el colon ascendente y descendente de *L. maximus* se identificaron algunos patrones de glicosilación que podrían ser explicados en función del estadio de maduración celular.

Al igual que en otros estudios histoquímicos, la técnica AB pH 2,8/PAS permitió evaluar la existencia de células caliciformes con diferentes patrones de glicosilación. Así, en el intestino grueso de *L. maximus* se identificaron células con tres perfiles histoquímicos diferentes – neutro, ácido y mixto –, mientras que en el intestino delgado sólo se caracterizaron dos tipos de secreción – neutra y mixta– a lo largo del eje cripta-vellosidad. De todos estos patrones de glicosilación, las células predominantes a lo largo del tracto intestinal de *L. maximus* fueron aquellas que evidenciaron secreción mixta. Este mismo tipo de secreción fue descrito por Boonzaier et al. (2013b) en el tracto gastrointestinal de tres especies de mamíferos insectívoros. Resultados similares fueron descritos por Tootian et al. (2013) utilizando técnicas histoquímicas en diferentes sectores del intestino delgado de la ardilla persa, *Sciurus anomalus*. Estas similitudes entre especies taxonómicamente lejanas sugieren que las mucinas mixtas son esenciales para la mayoría de los mamíferos, independientemente de su dieta o de su ubicación taxonómica. Por otro lado, la existencia de células caliciformes con diferentes patrones de glicosilación demuestra que funcionalmente existen distintas subclases de células caliciformes dentro de una población celular morfológicamente homogénea, tanto a nivel histológico como ultraestructural. Estas subpoblaciones de células caliciformes también han sido descritas

previamente en el epitelio colónico humano y de ratón usando anticuerpos contra diferentes tipos de mucinas intestinales (Podolsky et al., 1986; Gouyer et al., 2011).

En *L. maximus*, el perfil histoquímico de las células caliciformes varió considerablemente a lo largo del tracto intestinal, e incluso se identificaron cambios abruptos a nivel del surco colónico longitudinal. Estos resultados demuestran que, tal como ha sido descrito en otras especies de vertebrados, cada región anatómica del tracto intestinal presenta un patrón de glicosilación particular que, a su vez, se mantiene altamente conservado entre individuos de una misma especie. Actualmente, se propone que el patrón de glicosilación de las mucinas intestinales podría ser el resultado de un proceso co-evolutivo entre la flora bacteriana y el hospedador para mantener una relación simbiótica óptima (Johansson et al., 2011a, 2011b).

El análisis histoquímico de glicoconjugados (GCs) mostró a lo largo del tracto intestinal de *L. maximus* un gradiente creciente de sulfomucinas, asociado con un gradiente decreciente de mucinas con dioles vecinos oxidables. Estudios previos realizados en diferentes especies de mamíferos han descrito un patrón de glicosilación similar al de *L. maximus*. Estas investigaciones concuerdan en que existe un predominio de mucinas ácidas, tanto sulfatadas como con residuos de ácido siálico, en los diferentes segmentos del intestino grueso (Robbe et al., 2004; Boonzaier et al., 2013b).

Diversos autores han demostrado que los GCs ácidos, especialmente las GCs sulfatados, actúan como una barrera de defensa protegiendo al intestino de patógenos potenciales y de enzimas digestivas (Robertson y Wright, 1997; Beyaz y Liman, 2009). Investigaciones posteriores han llegado a conclusiones similares al observar que las células caliciformes de regiones intestinales colonizadas por microorganismos patógenos secretan principalmente mucinas ácidas (Nieuw Amerongen et al., 1998). Por otro lado, también se ha demostrado que las mucinas sulfatadas (sulfomucinas) son más resistentes a la degradación por acción de glicosidasas bacterianas y presentan un efecto inhibitorio más fuerte sobre el crecimiento

bacteriano que las mucinas no sulfatadas (Conour et al., 2002). Así mismo, estudios previos ya habían confirmado que la desulfatación enzimática del mucus colónico aumenta en gran medida su susceptibilidad a la degradación por glicosidasas de la flora intestinal (Rhodes et al., 1985). En base a estos estudios y a que la cantidad de bacterias intestinales aumenta en dirección próximo-distal (Pelaseyed et al., 2014), el gradiente de sulfomucinas encontrado a lo largo del tracto intestinal de *L. maximus* estaría posiblemente vinculado con las diferencias en la carga microbiana entre el intestino delgado y grueso. De esta manera, estos resultados también se corresponderían con otros estudios realizados en roedores donde se ha demostrado que la microflora modula específicamente el patrón de glicosilación intestinal, tanto a nivel celular como subcelular (Freitas et al., 2002; Moran et al., 2011). Así, tal como ha sido descrito en numerosos trabajos, el patrón de glicosilación a lo largo del tracto intestinal actuaría como un sistema sensible y dinámico capaz de adaptarse a requisitos fisiológicos locales, incluyendo cambios en la microflora intestinal (Moran et al., 2011).

En los mamíferos, la carga negativa de las mucinas está determinada principalmente por los grupos sulfato y los residuos de ácido siálico terminales (Liquori et al., 2012; Mastrodonato et al., 2014). La alta densidad de cargas negativas presentes en las mucinas intestinales atrae agua, con lo que se forma un gel altamente hidratado con propiedades viscoelásticas (Accili et al., 2008). En *L. maximus*, se identificaron sialomucinas a lo largo de todo el tracto intestinal aunque en menor proporción que las sulfomucinas. En general, los residuos de ácido siálico se encontraron altamente O-acetilados en la mayoría de las regiones estudiadas, con excepción del colon ascendente y el recto. Resultados similares fueron descritos por Mastrodonato et al. (2013) en el tracto intestinal de ratón. En cambio, estudios en humanos han reportado mucinas intestinales altamente sialiladas y con escasos residuos sulfatados (Robbe et al., 2004). A diferencia del patrón descrito en humanos, nuestros resultados indican que los grupos sulfato son los principales responsables en determinar el gradiente ácido del mucus intestinal.



Varios autores han sugerido que la acetilación de las sialomucinas disminuye la susceptibilidad del mucus a la degradación por la microflora intestinal a causa del impedimento estérico que generan los grupos acetilo (Mastrodonato et al., 2013, 2014). Si bien en general las sialomucinas se encontraron O-acetiladas a lo largo de todo el tracto intestinal de *L. maximus*, no se evidenciaron grandes diferencias entre los sectores analizados. Es por ello que, tal como ha sido propuesto por Liquori et al. (2012), el rol protector en la vizcacha de llanura probablemente esté desempeñado por mucinas altamente sulfatadas y carboxiladas (polianiónicas).

En los mamíferos, una característica morfológica particular de la submucosa duodenal es la presencia de glándulas de Brunner. Numerosos estudios han demostrado que los tipos celulares que conforman los adenómeros de estas glándulas varían entre las especies. Tal es así que, en lagomorfos se ha descripto la presencia de glándulas de Brunner con adenómeros mixtos compuestos por células mucosas y serosas (Ergün et al., 2010). En cambio, en varias especies de roedores histicomorfos y miomorfos se ha demostrado que estas glándulas están formadas sólo por células secretoras de mucus (Krause, 2000). Estos datos concuerdan con lo observado en *L. maximus*. Asimismo, estudios morfológicos e histoquímicos de estas glándulas duodenales han descripto diferencias notables entre especies, tanto en su distribución como en los tipos de GCs que secretan (Krause, 2000; Takehana et al., 2000; Verdiglione et al., 2002; Boonzaier et al., 2013a, 2013b; Scillitani y Mentino, 2015). En la mayoría de los mamíferos la distribución de las glándulas de Brunner está limitada únicamente a la submucosa, en cambio, en *L. maximus* además de estar presentes en todo el espesor de la túnica submucosa, algunos adenómeros se encontraron localizados en la lámina propia. Esta distribución también ha sido descripta por Skutelsky et al. (1989) en humanos y caninos.

En todos los mamíferos, la secreción de estas glándulas presenta un pH alcalino (8,1 a 9,3) que protege la mucosa duodenal al neutralizar el contenido ácido que llega desde el estómago (Schumacher et al., 2004). Las mucinas producidas por estas glándulas presentan la estructura

típica de esta clase de glicoproteínas, con cadenas de oligosacáridos principalmente O-ligados al esqueleto polipeptídico (Scillitani y Mentino, 2015). Estudios histoquímicos realizados en humanos, gatos domésticos y ratas, entre otras especies, han descripto que la secreción glandular está compuesta únicamente por GCs neutros (Krause, 2000). Por otro lado, sólo en pocas especies se ha determinado que las glándulas de Brunner secretan principalmente GCs ácidos (Takehana et al., 2000). En la vizcacha de llanura hemos hallado que los adenómeros de las glándulas de Brunner del área profunda de la submucosa muestran un perfil histoquímico diferente al de los adenómeros del área superficial. El patrón histoquímico de las glándulas de Brunner en *L. maximus* concuerda con el descripto por Verdiglione et al. (2002) en bovinos. En el duodeno de bovinos se han descripto diferentes grados de sulfatación entre los adenómeros de las glándulas de Brunner, siendo los adenómeros que se encuentran en la región más profunda de la submucosa los únicos que presentan sulfomucinas. Resultados similares también fueron recientemente descriptos en el duodeno de cobayos (Scillitani y Mentino, 2015). Este patrón podría deberse a la presencia de glándulas de Brunner en distintos estadios secretorios o a la existencia de dos subpoblaciones de glándulas que presentan patrones diferentes de glicosilación.

La técnica lectinhistoquímica ha sido empleada para localizar e identificar *in situ* diferentes residuos terminales y subterminales de azúcares monosacáridos presentes en los GCs de diversas especies (Schumacher et al., 2004; Scillitani et al., 2007; Fayed et al., 2010; Mastrodonato et al., 2014). Mediante esta técnica, en *L. maximus* fue posible caracterizar el patrón lectinhistoquímico del glicocáliz, enterocitos, células caliciformes, células de Paneth, glándulas de Brunner e ICC.

En el presente estudio, las células caliciformes presentaron una reacción positiva con las lectinas WGA y RCA-I en todas las regiones anatómicas estudiadas, lo que demuestra la presencia de N-acetilglucosamina, ácido N-acetilneuramínico y  $\beta$ -galactosa a lo largo de todo el tracto intestinal de *L. maximus*. En cambio, la afinidad de las lectinas Con-A, DBA, SBA, PNA y UEA-I por estas células varió considerablemente según el segmento intestinal. Este patrón

difiere de los resultados descriptos en otros mamíferos (Skutelsky et al., 1989; Galotta et al., 2009), lo que permite sugerir que el perfil lectinhistoquímico de estas glándulas unicelulares es característico de cada especie animal. En concordancia con nuestros resultados, Galotta et al. (2009) demostraron que el patrón lectinhistoquímico de las células caliciformes muestra una gran variación no sólo entre especies sino también según el segmento intestinal estudiado.

En el tracto intestinal de la mayoría de los mamíferos, los residuos de fucosa suelen presentarse tanto en mucinas secretoras y transmembrana como también en glicolípidos (Becker y Lowe, 2003). En el glicocálix y las células caliciformes de *L. maximus*, se observó una disminución en la marcación de UEA-I, lectina que presenta afinidad por residuos de L-fucosa, desde el duodeno hasta el recto. Estudios realizados en distintas especies también han mencionado un gradiente decreciente de este monosacárido a lo largo del tracto intestinal, lo que indica que en los mamíferos existe una regulación negativa de las fucosiltransferasas desde el intestino delgado al grueso (Robbe et al., 2004; Liquori et al., 2012). Experimentos con ratones mutantes libres de gérmenes han demostrado que el mantenimiento del gradiente de residuos fucosilados requiere de la presencia de bacterias coemensales, por lo que es posible que el patrón encontrando en *L. maximus* también esté determinado en gran medida por la microflora intestinal (Bry et al., 1996).

La lectina WGA reveló residuos terminales de N-acetilglucosamina (GlcNAc) en las células caliciformes de todo el tracto intestinal de *L. maximus*. Además, se observó un aumento en su patrón de marcación en dirección al intestino grueso. En mamíferos la presencia de GlcNAc está particularmente asociada con el grado de acidificación de las mucinas dado que los grupos sulfato están unidos generalmente a este monosacárido (Liquori et al., 2012). En el presente estudio se encontró una correspondencia entre el gradiente ácido de las mucinas secretoras y la distribución de residuos terminales de N-acetilglucosamina, en coincidencia con lo descripto por Liquori et al. (2012) en ratón.

La función secretora de los enterocitos consiste en la síntesis de enzimas glicoproteicas que se insertarán en la membrana plasmática apical de la célula. La biosíntesis de las cadenas de glicanos tiene lugar principalmente en compartimentos de la ruta retículo endoplasmático-Golgi, en reacciones que implican la actividad secuencial de glicosidasas y glicosiltransferasas (Gimeno y Barbeito, 2004). En el presente estudio, los enterocitos de la mayoría de los sectores intestinales presentaron una marcación supranuclear positiva con algunas de las lectinas empleadas. Al igual que ha sido demostrado en otros estudios lectinhistoquímicos, es probable que este patrón de marcación sea indicativo del proceso de glicosilación que sufren los GCs dentro del sistema de endomembranas (Gorelick et al., 1982; Gabrielli y Tomassoni, 2017). Como correlato morfológico, en estas células absortivas se observaron cisternas del Golgi en la región supranuclear y un RER muy desarrollado.

En correspondencia con los resultados histoquímicos, la lectina DBA marcó algunas células de las glándulas de Brunner localizadas en el área profunda de la submucosa, esto indica que sólo los adenómeros de dicha zona secretan GCs con residuos de N-acetilgalactosamina. El resto de las lectinas utilizadas presentaron afinidad tanto por las glándulas de Brunner del área superficial como por las del área profunda de la submucosa. Estos resultados son similares a los obtenidos por Skutelsky et al. (1989) en humanos y algunos primates del género *Macaca*. Sin embargo, en estas especies las glándulas de Brunner reaccionaron de forma homogénea con todas las lectinas empleadas. El método lectinhistoquímico evidenció, al igual que las técnicas AB pH 1,0 y AT pHs 5,6 y 4,2, la existencia de dos subpoblaciones de glándulas de Brunner, permitiendo también demostrar que las glándulas de Brunner de la zona profunda presentan GCs con residuos terminales diferentes a los que secretan los adenómeros de la zona superficial.

Investigaciones previas han demostrado que la presencia de grupos sulfato en una cadena de oligosacáridos puede interferir con las interacciones lectina-glicano (Martinez-Menarguez et al., 1992; Parillo et al., 2001). En el presente estudio se detectaron algunas diferencias entre los

resultados histoquímicos y lectin-histoquímicos. A pesar de que en el íleon de *L. maximus* las células caliciformes presentaron una reacción moderada con la técnica KOH/PA\*S, estas células exhibieron una marcación leve con WGA. Por otro lado, el método histoquímico reveló residuos de ácido siálico en el glicocáliz del íleon, aunque con WGA no se observó marcación. Dada la alta sulfatación de las mucinas ileales, las diferencias observadas entre la técnica KOH/PA\*S y WGA podrían deberse a una fuerte inhibición de las interacciones lectina-azúcar por los grupos sulfato presentes en los GCs. Por lo tanto, nuestros resultados podrían indicar que en el íleon la unión de WGA se encuentre posiblemente inhibida por la alta sulfatación de los residuos de ácido siálico terminales. Estos resultados son consistentes con otros estudios en roedores que han demostrado una mayor intensidad de marcación de ciertas lectinas, incluyendo WGA, después de un tratamiento previo de desulfatación (Liquori et al., 2012; Mastrodonato et al., 2013, 2014; Scillitani y Mentino, 2015). En futuros estudios se podrían utilizar métodos lectinhistoquímicos combinados con tratamientos químicos y enzimáticos para confirmar la presencia de residuos de ácido siálico altamente sulfatados en el íleon de *L. maximus*.

El mecanismo de separación colónica (MSC) ha sido estudiado en diferentes especies de lagomorfos y roedores (Björnhag y Snipes, 1999; Takahashi y Sakaguchi, 2000; Hagen et al., 2015). Sin embargo, al presente son escasos los estudios que han descripto las características histológicas de esta adaptación a la herbivoría (Snipes et al., 1988; Kotzé et al., 2009). De acuerdo a nuestras observaciones, la organización anatómica e histológica del surco colónico de *L. maximus* es similar a la de otros roedores histricomorfos, aunque también posee características que son distintivas de la especie. Las crestas colónicas de *L. maximus*, al igual que todas las especies de roedores que se han estudiado, presentan un centro de tejido conectivo con venas irregulares de gran calibre (Snipes et al., 1988; Kotzé et al., 2009). Es posible que, tal como ha sido propuesto por Kotzé et al. (2009), la presencia de estas grandes venas genere el hinchamiento de las crestas como consecuencia de la alta irrigación sanguínea, produciendo una

mayor compartimentalización del lumen. Dado que se ha descrito la existencia de estas grandes venas en todas las especies estudiadas es probable que el mecanismo de cierre del surco sea similar en todos los roedores. En algunas especies de la rata topo africana (Rodentia, Bathyergidae) se han observado proyecciones en los extremos de las crestas que facilitarían aún más el cierre del surco (Kotzé et al., 2009). En cambio, en *L. maximus*, al igual que en el coipo (*Myocastor coypus*), no se encontraron estructuras adicionales en las crestas que contribuyan a separar el lumen principal del surco (Snipes et al., 1988).

Por otro lado, también se observaron diferencias entre especies en la organización estructural de la túnica muscular. A diferencia de lo descrito por Kotzé et al. (2009) en seis especies de la subfamilia Bathyergidae, la túnica muscular de *L. maximus* exhibió un cambio significativo en ambas capas musculares a nivel del surco colónico. La túnica muscular del surco de *L. maximus* presentó una capa circular interna formada por haces de fibras musculares lisas separados por abundante tejido conectivo, mientras que la capa longitudinal externa disminuyó gradualmente de grosor hasta desaparecer a nivel de las crestas. Características histológicas similares fueron descritas en *M. coypus* aunque en este roedor los haces musculares de la capa circular interna presentaron una organización diferente a la de *L. maximus* (Snipes et al., 1988). Por el contrario, en las seis especies de la rata topo desnuda estudiadas por Kotzé et al. (2009) se observó un aumento en el grosor de la capa longitudinal externa exactamente debajo de las crestas que limitan el surco. Si bien existen diferencias notables entre especies, en todos los roedores estudiados se han descrito cambios en las características histológicas de la túnica muscular a la altura de las crestas. Esta alta especialización estructural del tejido muscular posiblemente esté relacionada con los mecanismos antiperistálticos que se producen en el surco colónico para transportar el contenido luminal en sentido retrógrado (Takahashi y Sakaguchi, 2006). Por otro lado, en *L. maximus* es probable que los fascículos musculares que conforman la capa circular

interna de la túnica muscular actúen como unidades funcionales individuales para en conjunto cumplir con un rol específico.

Diversos estudios han demostrado que en los roedores el MSC transporta una mezcla de bacterias y mucus desde el colon ascendente hasta el ciego para mantener el proceso de fermentación bacteriana (Snipes et al., 1988; Takahashi and Sakagushi, 2000). El transporte selectivo de bacterias hacia el ciego se produce por acción de las mucinas que son secretadas en el surco colónico y es por ello que se lo considera un mecanismo dependiente de mucus (Sakaguchi, 2003). A pesar de que el funcionamiento del MSC depende en gran medida del mucus que es sintetizado por las células caliciformes del surco, hasta el momento no se habían desarrollado investigaciones exhaustivas sobre sus características histoquímicas. El presente estudio es el primero en realizar un análisis completo sobre el patrón de glicosilación de las mucinas que son secretadas tanto dentro como fuera del surco colónico ya que, hasta ahora, la mayoría de las investigaciones se han enfocado en las características morfológicas y fisiológicas de esta adaptación anatómica (Snipes et al., 1988; Takahashi y Sakaguchi, 2000, 2006; Kotzé et al., 2006, 2009).

La expresión de los GCs fue diferente entre las células caliciformes que se encuentran dentro y fuera del surco colónico. Esta variación del perfil histoquímico del colon ascendente a nivel de las crestas sugiere que el patrón de glicosilación del mucus tiene un rol clave en el funcionamiento del surco de *L. maximus*. Tal como ha sido descrito por Hansson (2012) el mucus puede atrapar a las bacterias que se encuentran en el lumen del tracto intestinal de varias maneras. En primer lugar, los microorganismos pueden quedar atrapados en los poros que son formados por el entramado de los diferentes tipos de mucinas, o bien las bacterias pueden unirse a la gran variedad de glicanos del mucus mediante adhesinas fimbrias y afimbrias que reconocen de manera específica diferentes tipos de residuos de hidratos de carbono. Dada la importancia de la composición del mucus en la agregación bacteriana es posible que el perfil



histoquímico particular del surco colónico genere sitios específicos de anclaje para la alta densidad de bacterias presentes en esta región.

Actualmente existen evidencias que demuestran que las mucinas interactúan y responden de forma dinámica y adaptativa a la microflora intestinal (Corfield, 2015). Freitas et al. (2002) han demostrado que la microbiota induce modificaciones en la glicosilación de las mucinas intestinales, produciendo un incremento en la secreción de mucinas sulfatadas. De manera similar, nuestros resultados revelaron que el mucus que es secretado por las células caliciformes del surco colónico presenta una mayor proporción de sulfomucinas respecto del que es producido por el resto de las células caliciformes del colon ascendente. Algunos estudios han demostrado que los grupos sulfato le confieren al mucus mayor resistencia a la degradación por glicosidasas bacterianas y proteasas del hospedador (Roberton y Wright, 1997; McGuckin et al., 2011). Así mismo, experimentos *in vitro* han determinado que las mucinas altamente sulfatadas son capaces de reducir el crecimiento de algunos tipos de bacterias en comparación con las mucinas no sulfatadas (Chance y Mawhinney, 2000). Además, investigaciones realizadas sobre el desarrollo ontogénico del tracto intestinal de mamíferos han demostrado un incremento en la secreción de mucinas ácidas durante los estadios fetales que posiblemente contribuyan a mejorar la respuesta inmunológica innata en etapas prenatales (Beyaz y Liman, 2009). En relación a estos antecedentes, y dado que el lumen del surco colónico transporta una mayor concentración de bacterias que el lumen principal del colon ascendente (Takahashi y Sakaguchi, 2006), es posible que las sulfomucinas estén implicadas en la protección de la mucosa del surco impidiendo la proliferación de microorganismos patógenos.

El análisis histoquímico también reveló diferencias entre el surco colónico y el lumen principal en relación a los diferentes tipos de sialomucinas que secretan las células caliciformes de ambos sectores. Si bien se evidenció la presencia de GCs con residuos de ácido siálico en todas las células caliciformes del colon ascendente, nuestros resultados demostraron que sólo en

el lumen principal de *L. maximus* se secretan GCs con residuos de ácido siálico O-acil sustituido en C7, C8 y/o C9. De manera similar, otros estudios han descripto una alta proporción de sialomucinas O-acetiladas en el colon de humanos y mamíferos roedores (Accili et al., 2008; Mastrodonato et al., 2013). Tal como ha sido propuesto previamente (Angata y Varki, 2002), la acetilación de los residuos de ácido siálico puede modificar sustancialmente su papel funcional en los diferentes procesos biológicos. El mayor grado de acetilación de los residuos de ácido siálico que son secretados por las células caliciformes del lumen principal posiblemente alternen las propiedades viscoelásticas y protectoras del mucus, confiriéndole mayor resistencia a las neuroaminidasas bacterianas (Mastrodonato et al., 2013).

El patrón de unión a lectinas también presentó algunas variaciones entre el surco colónico y el lumen principal del colon ascendente de *L. maximus*, tanto en el glicocáliz como en las células caliciformes. Freitas et al. (2002) han demostrado, al comparar el patrón de glicosilación del intestino de ratones convencionales con el de ratones libres de gérmenes, que la microflora modula el patrón lectinhistoquímico de las mucinas secretadas. Estos resultados sugieren nuevamente que las diferencias encontradas podrían ser el resultado de la interacción entre las mucinas y las bacterias que son transportadas a través del surco colónico.

La actividad motora del tracto gastrointestinal (TGI) es un proceso fisiológico complejo que implica la interacción de tres tipos celulares: las neuronas entéricas, las ICC y las células musculares lisas (Mazet, 2015). Los avances realizados durante las últimas décadas han permitido lograr una mejor comprensión del rol que cumplen las ICC en el TGI, demostrando que son parte integral del aparato motor gastrointestinal (Mazzone y Farrugia, 2007). Con el advenimiento de la inmunohistoquímica anti-c-kit ha sido posible observar la presencia de ICC en el TGI de diferentes especies de mamíferos (Morini et al., 2004; Márquez et al., 2006; Pavone et al., 2012). En el presente trabajo, la inmunomarcación anti c-kit junto con la microscopía electrónica permitieron demostrar por primera vez la presencia de ICC en el tracto intestinal de

*L. maximus*. Asimismo, esta es la primera investigación que describe el patrón de distribución de las ICC en el surco colónico de roedores.

Las ICC han sido descritas al MET en el TGI de diversas especies de mamíferos (Komuro, 1999; Wang et al., 1999; Rumessen et al., 2009). Estas investigaciones han revelado que este tipo celular posee características ultraestructurales propias que posibilitan su diferenciación de otras células mesenquimáticas. En el presente estudio, se identificaron en la región del plexo mientérico del colon ascendente y descendente células fusiformes o estrelladas con largas prolongaciones, muchas de ellas en estrecho contacto con fibras nerviosas y células contiguas. Otras características distintivas de estas células fueron la presencia de cavéolas y abundantes mitocondrias. En función a los criterios de indentificación propuestos por Faussone-Pellegrini y Thuneberg (1999), las células presentes en el colon de *L. maximus* podrían, por su ultraestructura y distribución, ser consideradas ICC-MP. Además, estas células pudieron ser diferenciadas de fibroblastos, lo que refuerza su reconocimiento como ICC.

Estudios ultraestructurales sobre las ICC han descripto que la morfología de este tipo celular varía no sólo entre especies sino también entre las distintas regiones del tracto gastrointestinal (Huizinga et al., 1997; Faussone-Pellegrini y Thuneberg, 1999; Komuro et al., 1999). La presencia de una membrana basal incompleta y numerosas cavéolas han sido observadas en ICC-MP de ratón, perro y humano (Torihashi et al., 1994; Komuro et al., 1999; Min y Seo, 2003; Rumessen et al., 2009), mientras que estas características raramente han sido descritas en otras especies de roedores, tales como rata y cobayo (Ishikawa y Komuro, 1996; Komuro et al., 1999). En las ICC-MP de *L. maximus* no se identificó una membrana basal pero si se observaron cavéolas. El número y longitud de las prolongaciones celulares y la cantidad de cavéolas son algunas de las características ultraestructurales que variaron entre las ICC del colon ascendente y descendente de *L. maximus*.

El análisis inmunohistoquímico puso en evidencia células c-kit positivas a lo largo de todo el tracto intestinal de *L. maximus*. Sin embargo, al igual que en otras especies de mamíferos, el patrón de distribución de estas células en las distintas capas del tubo intestinal varió según la región anatómica estudiada. En el presente estudio, la principal variación se observó en la distribución de las ICC-CM e ICC-LM, que en conjunto reciben el nombre de ICC-intramusculares (ICC-IM). Si bien ambas subpoblaciones exhibieron una morfología similar, la intensidad y el patrón de marcación en ambas capas de la túnica muscular varió a lo largo del tracto intestinal de *L. maximus*. Diversos estudios inmunohistoquímicos han demostrado que el patrón de distribución de las ICC-IM no sólo es particular del órgano considerado dentro del TGI sino también de la especie (Hanani et al., 2005; Garcia-Lopez et al., 2009; Márquez et al., 2006).

En todos los sectores del intestino delgado y grueso de *L. maximus* se identificaron células multipolares c-kit positivas en relación con el plexo mientérico. Estas células presentaron una morfología y distribución similar a la descrita en otras especies de mamíferos, por lo que en el presente estudio fueron clasificadas como ICC-MP (Torihashi et al., 1999; Hanani et al., 2005; Chen et al., 2007). El registro de actividad eléctrica en las ICC-MP presentes en el intestino de ratón y humano demostró que esta subpoblación es la responsable de originar las ondas lentas que generan la actividad eléctrica espontánea del músculo liso del tracto digestivo (Kito et al., 2005; Sanders et al., 2006). Dado que en el presente trabajo las ICC-MP exhiben una morfología y un patrón de distribución similar a lo descrito en ratón y humano, es posible que en *L. maximus* las ICC-MP también actúen como células marcapaso.

Si bien las ICC- del borde submucoso (ICC-SM) han sido descritas como células generadoras de ondas lentas en el colon de otros mamíferos (Mazzone y Farrugia, 2007), nuestros resultados demostraron que esta subpoblación se encuentra, dentro del colon ascendente, limitada únicamente al surco colónico de *L. maximus*. Este patrón de distribución de las ICC-SM dentro del surco sugiere que cumplen una función fisiológica especializada en esta

región anatómica. Dado que se ha demostrado que el surco transporta principalmente bacterias en sentido retrógrado mediante mecanismos antiperistálticos es posible que la actividad motora de esta región esté relacionada con el patrón de distribución particular de las ICC-SM.

Existen escasos estudios morfométricos de las ICC en el tracto intestinal de mamíferos (Hanini et al., 1998; Wedel et al., 2002; Belzer et al., 2002; Aranishi et al., 2009; Márquez et al., 2006, 2014). En algunas de estas investigaciones ha sido posible determinar el tamaño de los cuerpos celulares y el largo de las prolongaciones de las diferentes subpoblaciones de ICC. En el presente trabajo, en cambio, sólo se pudieron establecer los parámetros morfométricos del cuerpo celular dado que no fue posible seguir el trayecto de las prolongaciones. A pesar de esta dificultad, la morfología de los cuerpos celulares analizados fue similar a la descrita en cobayos y ratones (Hanini et al., 1998; Belzer et al., 2002; Aranishi et al., 2009). En ambas especies de roedores se han identificado ICC bipolares y multipolares, ambos tipos de aspecto fusiforme con finas y largas prolongaciones. Esta morfología se corresponde con la observada en *L. maximus* dado que, tal como demuestra la relación entre el eje mayor y menor de los cuerpos celulares, todas las células c-kit positivas analizadas por morfometría presentaron un cuerpo fusiforme. Esta característica también es coincidente con el fenotipo alargado descrito en otras especies tales como humanos, equinos y bovinos (Hudson et al., 1999; Torihashi et al., 1999; Márquez et al., 2014).

Al comparar los parámetros morfométricos de las células inmunomarcadas en el presente estudio con los resultados descriptos por Márquez (2010) y Galotta (2010) en bovinos, equinos y porcinos, estas resultan considerablemente de mayor tamaño en *L. maximus*. En estudios previos también se han descriptos diferencias significativas en el tamaño de células c-kit positivas entre bovinos y otras especies de roedores, siendo el diámetro de estas células de menor longitud en los rumiantes (Márquez et al., 2006; 2014). A partir de estos resultados morfométricos es posible inferir que los roedores presentan células c-kit positivas de mayores dimensiones que otros

mamíferos. Esta diferencia de tamaño celular entre los órdenes mencionados, en principio, no podría ser explicada en función del desarrollo de la pared del órgano tal como ha sido propuesto por Galotta (2010) al estudiar las características morfométricas de las ICC en diferentes especies de mamíferos.

En el análisis estadístico se observó un incremento significativo del tamaño de las células c-kit positivas hacia la región distal del tracto intestinal de *L. maximus*. Además, se encontraron diferencias de mayor significación entre las ICC-SMP del surco colónico y las ICC-MP de la mayoría de los sectores anatómicos estudiados. Si bien no contamos con datos morfométricos en otras especies, es posible que este aumento en las dimensiones celulares esté asociado a un mayor desarrollo de la túnica muscular del surco colónico y los sectores distales del intestino grueso. Además, las diferencias observadas entre las células c-kit positivas del surco y el resto de los sectores anatómicos podrían deberse a que la comparación se realizó entre dos subpoblaciones de ICC diferentes.

La marcación con las lectinas Con-A, WGA y RCA-I puso en evidencia, a lo largo del tracto intestinal de *L. maximus*, células en relación con el plexo mientérico, las fibras musculares lisas de la capa circular y longitudinal y la subserosa. Estas lectinas revelaron un patrón de marcación similar al obtenido por inmunomarcación anti c-kit por lo que se podría sugerir estas tres lectinas presentan afinidad por las ICC. Estudios realizados con las mismas lectinas han sido descripto un perfil lectinhistoquímico similar en bovinos, cerdos y caballos (Galotta, 2010; Márquez, 2010). Estos resultados indicarían que el patrón de glicosilación de las ICC se encuentra conservado entre distintas especies.

## CONCLUSIONES

---

- La organización estructural del tracto intestinal en la vizcacha de llanura (*Lagostomus maximus*) es similar a la descrita en otros roedores histricognatos, tanto africanos como sudamericanos.
- El epitelio intestinal de *L. maximus* exhibe características ultraestructurales particulares de la especie, como la complejidad estructural de los gránulos de las células de Paneth y la presencia de dos tipos de enterocitos que difieren en la electron-densidad de su citoplasma.
- El patrón de glicosilación del tracto intestinal de *L. maximus* varía según la región anatómica y, a su vez, se mantiene altamente conservado entre individuos de una misma especie.
- Las células caliciformes presentan diferentes patrones de glicosilación, siendo las células de secreción mixta el tipo celular predominante. Esto demuestra que funcionalmente existen distintas subclases de células caliciformes dentro de una población celular morfológicamente homogénea.
- Los glicoconjugados (GCs) presentan a lo largo del tracto intestinal de *L. maximus* un gradiente creciente de sulfomucinas, asociado con un gradiente decreciente de mucinas con dioles vecinos oxidables y residuos de fucosa.
- Las mucinas secretadas por las células caliciformes del intestino grueso de *L. maximus* presentan una alta proporción de glicanos sulfatados y polianiónicos. Es posible que los GCs ácidos incrementen la carga negativa del mucus y le confieran mayor resistencia a la degradación por glicosidasas bacterianas y proteasas del hospedador.
- Los residuos de ácido siálico se encuentran altamente O-acetilados en la mayoría de las regiones estudiadas, con excepción del colon ascendente y el recto.
- En *L. maximus*, los grupos sulfato son los principales responsables en determinar el gradiente ácido del mucus intestinal.



- Los adenómeros de las glándulas de Brunner del área profunda de la submucosa presentan un perfil histoquímico diferente al de los adenómeros del área superficial. Este patrón podría deberse a la presencia de glándulas de Brunner en distintos estadios secretorios o a la existencia de dos subpoblaciones de glándulas que presentan patrones diferentes de glicosilación.
- Los enterocitos de la mayoría de los sectores intestinales exhiben una marcación supranuclear positiva con algunas de las lectinas empleadas. Es probable que este patrón de marcación sea indicativo del proceso de glicosilación que sufren los GCs dentro del sistema de endomembranas.
- El colon ascendente presenta una adaptación anatómica denominada surco colónico longitudinal (SCL). Como esta estructura es considerada un prerrequisito para la práctica de la coprofagia, la existencia de un SCL demuestra que *L. maximus* utiliza esta estrategia digestiva.
- Al igual que en otros roedores, es probable que las crestas del SCL compartimentalicen parcialmente el lumen del colon ascendente. Las grandes venas presentes en la submucosa de las crestas podrían participar en el cierre total del surco.
- La túnica muscular del SCL de *L. maximus* presenta únicamente una capa circular formada por haces de fibras musculares lisas separados por abundante tejido conectivo. Esta alta especialización estructural del tejido muscular posiblemente esté relacionada con los mecanismos antiperistálticos que se producen en el SCL para transportar el contenido luminal en sentido retrógrado.
- El perfil histoquímico del colon ascendente de *L. maximus* cambia abruptamente a nivel de las crestas. Esta variación sugiere que el patrón de glicosilación del mucus tiene un rol clave en el funcionamiento del SCL.

- La inmunomarcación anti c-kit junto con la microscopía electrónica demuestran por primera vez la presencia de ICC en las diferentes regiones anatómicas analizadas del tracto intestinal de *L. maximus*.
- El patrón de distribución de las ICC en las distintas capas del tubo intestinal varía según la región anatómica estudiada.
- El análisis inmunohistoquímico anti-c-kit del colon ascendente revela que el subtipo ICC-SMP se localiza únicamente en el SCL de *L. maximus*, lo que podría explicar en parte la actividad motora antiperistáltica de esta región.
- Las lectinas Con-A, WGA y RCA-I revelan un patrón de marcación similar al obtenido por inmunomarcación anti c-kit.
- Todas las células c-kit positivas analizadas por morfometría presentan un cuerpo fusiforme.
- El tamaño de las ICC-MP es significativamente mayor en las regiones distales del tracto intestinal.
- Las ICC-SMP presentes en el SCL son más alargadas (fusiformes) y de mayor tamaño que las ICC-MP.
- El análisis integrado de las características anatómicas, histológicas e histoquímicas del tracto intestinal de *L. maximus* permite una interpretación funcional de los tipos celulares y sustancias secretadas, y aporta un mejor entendimiento de las adaptaciones morfofuncionales que emplean los herbívoros para lograr una mayor eficiencia digestiva.
- Los resultados generados en el presente trabajo ayudan a comprender la importancia del rol que cumplen las mucinas y las ICC en el funcionamiento del SCL de *L. maximus*, sentando las bases morfológicas e histoquímicas para realizar un estudio comparativo con el MSC de otros roedores.
- La información generada en este trabajo podría ser utilizada como herramienta biológica relevante para determinar, comparar y analizar posibles cambios en la glicosilación de las

mucinas intestinales bajo diversas condiciones, como estados patológicos y cambios en la dieta de *L. maximus*.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abaurrea-Equisoain MA, Ostos-Gamido MV. 1996. Enterocytes in the anterior intestine of *Oncorhynchus mykiss*: Cytological characteristics related to osmoregulation. *Aquaculture* 139: 109–116.
- Accili D, Menghi G, Gabrielli MG. 2008. Lectin histochemistry for in situ profiling of rat colon sialoglycoconjugates. *Histology and Histopathology* 23: 863–875.
- Aiken KD, Roth KA. 1992. Temporal differentiation and migration of substance P, serotonin, and secretin immunoreactive enteroendocrine cells in the mouse proximal small intestine. *Developmental Dynamics* 194: 303–310.
- Al-Shboul OA. 2013. The Importance of Interstitial Cells of Cajal in the Gastrointestinal Tract. *The Saudi Journal of Gastroenterology* 19: 3–15.
- Álvarez MR, Martínez RA. 2006. Suborden Histricognathi. En: Mamíferos de Argentina, sistemática y distribución. Barquez RM, Diaz M, Ojeda RA (Editores). SAREM. 359 p.
- Angata T, Varki A. 2002. Chemical Diversity in the Sialic Acids and Related  $\alpha$ -Keto Acids: An Evolutionary Perspective. *Chemical Reviews* 102: 439-469.
- Aranishi H, Kunisawa Y, Komuro T. 2009. Characterization of interstitial cells of Cajal in the subserosal layer of the guinea-pig colon. *Cell Tissue Research* 335: 323–329.
- Arellano JM, Storch V, Sarasquete C. 2002. Ultrastructural study on the intestine of Senegal sole, *Solea senegalensis*. *Journal of Applied Ichthyology* 18: 154–158.
- Arias SM. 2000. Efectos de la actividad de la vizcacha (*Lagostomus maximus*) sobre la vegetación y el suelo en una antigua laguna litoral de la región del Delta del Paraná. Tesis de Licenciatura. Universidad de Buenos Aires. 69 pp.
- Arias SM, Madanes N, Quintana RD. 2003. Estructura y composición de la vegetación en vizcacheras activas e inactivas en el delta de Paraná. *Mastozoología Neotropical, Journal of Neotropical Mammalogy* 10(1): 9–20.

- Bansil R, Turner BS. 2006. Mucin structure, aggregation, physiological functions and biomedical applications. *Current Opinion in Colloid and Interface Science* 11: 164-170.
- Becker DJ, Lowe JB. 2003. Fucose: Biosynthesis and biological function in mammals. *Glycobiology* 13: 41R–53R.
- Beckett EAH, Takeda Y, Yanase H, Sanders KM, Ward SM. 2005. Synaptic Specializations Exist between Enteric Motor Nerves and Interstitial Cells of Cajal in the Murine Stomach. *The Journal of Comparative Neurology* 493: 193–206.
- Belzer V, Kobil T, Rich A, Hanani M. 2002. Intercellular coupling among interstitial cells of Cajal in the guinea pig small intestine. *Cell Tissue Research* 307: 15–21.
- Berezin I, Huizinga JD, Faraway L, Daniel EE. 1990. Innervation of interstitial cells of Cajal by vasoactive intestinal polypeptide containing nerves in canine colon. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 68: 922–932.
- Bergen WG. 2015. Small-intestinal or colonic microbiota as a potential amino acid source in animals. *Amino Acids* 47: 251–258.
- Bevins CL. 2004. The Paneth cell and the innate immune response. *Current Opinion in Gastroenterology* 20: 572–580.
- Beyaz F, Liman N. 2009. The Prenatal Development and Histochemistry of the Ileal Mucins in the Bovine Fetuses. *Anatomia, Histologia, Embryologia* 38: 436–442.
- Birchenough GMH, Johansson MEV, Gustafsson JK, Bergström JH, Hansson GC. 2015. New developments in goblet cell mucus secretion and function. *Mucosal Immunology* 8: 712–719.
- Bjerknes M, Cheng H. 2006. Neurogenin 3 and the enteroendocrine cell lineage in the adult mouse small intestinal epithelium. *Developmental Biology* 300: 722–735.
- Björnhag G, Snipes RL. 1999. Colonic Separation Mechanism in Lagomorph and Rodent Species - a Comparison. *Zoosystematics and Evolution* 75: 275–281.

- Bloom W, Fawcett DW. 1994. A textbook of histology. 12a ed. New York: Chapman y Hall. 964 p.
- Bollinger RR, Barbasa AS, Busha EL, Lin SS, Parker W. 2007. Biofilms in the large bowel suggest an apparent function of the human vermiform appendix. *Journal of Theoretical Biology* 249: 826–831.
- Bontti EE, Boo RM, Lindström LI, Elia OR. 1999. Botanical composition of cattle and vizcacha diets in central Argentina. *Journal of Range Management* 52: 370–377.
- Boonzaier J, Van der Merwe EL, Bennett NC, Kotzé SH. 2013a. Comparative gastrointestinal morphology of three small mammalian insectivores: *Acomys spinosissimus* (Rodentia), *Crociodura cyanea* (Eulipotyphla), and *Amblysomus hottentotus* (Afrosoricida). *Journal of Morphology* 274: 615–626.
- Boonzaier J, Van der Merwe EL, Bennett NC, Kotzé SH. 2013b. A comparative histochemical study of the distribution of mucins in the gastrointestinal tracts of three insectivorous mammals. *Acta Histochemica* 115: 549–556.
- Branch L. 1993. Intergroup and intragroup spacing in the plains vizcacha, *Lagostomus maximus*. *Journal of Mammalian Evolution* 74(4): 890–900.
- Branch L, Hierro JL, Villareal D. 1999. Patterns of plant species diversity following local extinction of the plains vizcacha in semi arid scrub. *Journal of Arid Environments* 41(2): 173–182.
- Brookes SJH. 2001. Classes of Enteric Nerve Cells in the Guinea-Pig Small Intestine. *Anatomical Record* 262: 58–70.
- Brüel A, Christensen EI, Qvortrup K, Trandum-Jensen J, Geneser F. 2015. Geneser Histología. 4º edición. Editorial Médica Panamericana. 754 p.
- Bry L, Falk PG, Midtvedt T, Gordon J. 1996. A Model of Host-Microbial Interactions in an Open Mammalian Ecosystem. *Science* 273: 1380–1383.

- Bullen TF, Forrest S, Campbell F, Dodson AR, Hershman MJ, Pritchard DM, Turner JR, Montrose MH, Watson AJM. 2006. Characterization of epithelial cell shedding from human small intestine. *Laboratory Investigation* 86: 1052–1063.
- Burns AJ, Loma AEJ, Torihashi S, Sanders KM, Ward SM. 1996. Interstitial cells of Cajal mediate inhibitory neurotransmission in the stomach. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93: 12008–12013.
- Chance DL, Mawhinney TP. 2000. Carbohydrate sulfation effects on growth of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 146: 1717–1725.
- Chen H, Ördög T, Chen J, Young DL, Bardsley MR, Redelman D, Ward SM, Sanders KM. 2007. Differential gene expression in functional classes of interstitial cells of Cajal in murine small intestine. *Physiological Genomics* 31: 492–509.
- Chevalier L, Selim J, Genty D, Baste JM, Piton N, Boukhalfa I, Hamzaoui M, Pareige P, Richard V. 2017. Electron microscopy approach for the visualization of the epithelial and endothelial glycocalyx. *Morphologie* 101: 55–63.
- Clauss M, Besselmann D, Schwarm A, Ortmann S, Hatt JM. 2007. Demonstrating coprophagy with passage markers? The example of the plains viscacha (*Lagostomus maximus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 147(2): 453–459.
- Clevers HC, Bevins CL. 2013. Paneth Cells: Maestros of the Small Intestinal Crypts. *Annual Review of Physiology* 75: 289–311.
- Collaco AM, Jaka RL, Hoekstra NE, Mitchell KA, Brooks A, Ameen NA. 2013. Regulated traffic of anion transporters in mammalian Brunner's glands: a role for water and fluid transport. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 305: G258–G275.



- Commission on Life Sciences National Research Council 1996. Institute of Laboratory Animals Resources. Guide for the care and use of laboratory animals. Washington D.C.: Editorial National Academic Press.
- Conour JE, Ganessunker D, Tappenden KA, Donovan SM, Gaskins HR. 2002. Acidomucin goblet cell expansion induced by parenteral nutrition in the small intestine of piglets. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 283: G1185–G1196.
- Corfield AP. 2015. Mucins: A biologically relevant glycan barrier in mucosal protection. *Biochimica et Biophysica Acta* 1850: 236–52.
- Corr SC, Gahan CGM, Hill C. 2008. M-cells: origin, morphology and role in mucosal immunity and microbial pathogenesis. *Medical Microbiology and Immunology* 52: 2–12.
- Crosnier C, Stamatakis D, Lewis J. 2006. Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. *Nature Reviews* 7: 349–359.
- Cruceño AAM, Aguilera Merlo CI, Chaves EM, Mohamed F H. 2017. Epididymis of Viscacha (*Lagostomus maximus maximus*): A Morphological Comparative Study in Relation to Sexual Maturity. *Anatomia, Histologia, Embryologia* 46(1): 73–84.
- Culling CFA, Reid PE, Dunn WL. 1976. A new histochemical method for the identification and visualization of both side-chain acylated and non-acylated sialic acids. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 24: 1225–1230.
- De Lisle RC. 2014. Disrupted tight junctions in the small intestine of cystic fibrosis mice. *Cell and Tissue Research* 355: 131–142.
- Dellman HD, Eurell JA. 1998. Textbook of veterinary histology. 5th ed. Baltimore, USA: Williams y Wilkins. 380 p.
- Dharmani P, Srivastava V, Kissoon-Singh V, Chadee K. 2009. Role of intestinal mucins in innate host defense mechanisms against pathogens. *Journal of Innate Immunity* 1: 123–135.

- Díaz AO, García AM, Escalante AH, Goldemberg AL. 2010. Glycoproteins histochemistry of the gills of *Odontesthes bonariensis* (Teleostei, Atherinopsidae). *Journal of Fish Biology* 77: 1665–1673.
- Elissamburu A, Vizcaíno SF. 2004. Limb proportions and adaptations in caviomorph rodents (Rodentia: Caviomorpha). *Journal of Zoology Zoological Society of London* 262: 145–159.
- Ergün E, Ergün L, Özen A, Kürüm A. 2010. Histomorphology of the Brunner's glands in the Angora Rabbit. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 9: 887–891.
- Ermund A, Schütte A, Johansson MEV, Gustafsson JK, Hansson GC. 2013. Studies of mucus in mouse stomach, small intestine, and colon. I. Gastrointestinal mucus layers have different properties depending on location as well as over the Peyer's patches. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 305: G341–G347.
- Fakhry J, Wangl J, Martins P, Fothergill1 LJ, Hunne B. 2017. Distribution and characterisation of CCK containing enteroendocrine cells of the mouse small and large intestine. *Cell and Tissue Research* DOI 10.1007/s00441-017-2612-1.
- Falk P, Roth KA, Gordon JI. 1994. Lectins are sensitive tools for defining the differentiation programs of mouse gut epithelial cell lineages. *American Journal of Physiology* 266: 987–1003.
- Falk P, Lorenz RG, Sharon N, Gordon, JI. 1995. Moluccella laevis lectin, a marker for cellular differentiation programs in mouse gut epithelium. *American Journal of Physiology* 268: 553–567.
- Faussone-Pellegrini MS, Thuneberg L. 1999. Guide to the Identification of Interstitial Cells of Cajal. *Microscopy Research and Technique* 47: 248–266.
- Fayed MH, Elnasharty M, Shoaib M. 2010. Localization of sugar residues in the stomach of three species of monkeys (*Tupaia glis*, *Nycticebus cocang* and *Callithrix jacchus*) by lectin histochemistry. *International Journal of Morphology* 28: 111–120.

- Filippa V, Mohamed F. 2010. Morphological and morphometric changes of pituitary lactotrophs of viscacha (*Lagostomus maximus maximus*) in relation to reproductive cycle, age, and sex. *Anatomical Record* 293: 150–161.
- Flamini MA. 2005. Estudio anatómico e histológico del aparato reproductor de la vizcacha de llanura hembra (*Lagostomus maximus maximus*). Tesis Doctoral. Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Ciencias Veterinarias. La Plata, Argentina. 180 pp.
- Flamini MA, Barbeito CG, Gimeno EJ, Portiansky EL. 2009. Histology, histochemistry and morphometry of the ovary of the adult plains viscacha (*Lagostomus maximus*) in different reproductive stages. *Acta Zoologica* 90: 390–400.
- Flamini MA, Portiansky EL, Favaron PO, Martins DS, Ambrosio CE, Mess AM, Miglino MA, Barbeito CG. 2011. Chorioallantoic and yolk sac placentation in the plains viscacha (*Lagostomus maximus*) – A caviomorph rodent with natural polyovulation. *Placenta* 32: 963–968.
- Flamini M, Díaz A, Barbeito C, Portiansky E. 2012. Morphology, morphometry, histochemistry and lectin histochemistry of the vagina of the plains viscacha (*Lagostomus maximus*). *Biotechnic & Histochemistry* 87: 81–94.
- Freitas M, Axelsson LG, Cayuela C, Midtvedt T, Trugnan G. 2002. Microbial–host interactions specifically control the glycosylation pattern in intestinal mouse mucosa. *Histochemistry and Cell Biology* 118: 149–161.
- Furness JB. 2012. The enteric nervous system and neurogastroenterology. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 9: 286–294.
- Gabrielli MG, Tomassoni D. 2017. Starch-enriched diet modulates the glucidic profile in the rat colonic mucosa. *European Journal of Nutrition*, <https://doi.org/10.1007/s00394-017-1393-3>.

- Galotta JM, Marquez SG, Zanuzzi CN, Gimeno EJ, Portiansky EL, Barbeito CG. 2009. Lectin binding pattern of intestinal goblet cell in horse, pig and rabbit. *Animal Biology Journal* 1: 49–55.
- Galotta JM. 2010. Descripción de las características morfológicas y del patrón de distribución de las células intersticiales de Cajal en el tubo gastrointestinal del caballo (*Equus caballus*), cerdo (*Sus scrofa*), gato (*Felis catus*) y conejo (*Oryctolagus coniculus*). Tesis Doctoral, UNLP. La Plata, Argentina.
- Garabedian EM, Roberts LJJ, McNevin MS, Gordon JI. 1997. Examining the Role of Paneth Cells in the Small Intestine by Lineage Ablation in Transgenic Mice. *Journal of Biological Chemistry* 272: 23729–23740.
- Garcia-Lopez P, Garcia-Marin V, Martínez-Murillo R, Freire M. 2009. Updating old ideas and recent advances regarding the Interstitial Cells of Cajal. *Brain Research Reviews* 61: 154–169.
- Gassler N, Newrzella D, Böhm C, Lyer S, Li L, Sorgenfrei O, van Laer L, Sido B, Mollenhauer J, Poustka A, Schirmacher P, Gretz N. 2006. Molecular characterisation of non-absorptive and absorptive enterocytes in human small intestine. *Gut* 55: 1084–1089.
- Gebert A, Fassbender S, Werner K, Weissferdt A. 1999. The Development of M Cells in Peyer's Patches Is Restricted to Specialized Dome-Associated Crypts. *American Journal of Pathology* 154: 1573–1582.
- Gil E, Forneris M, Domínguez S, Penissi A, Fogal T, Piezzi RS, Scardapane L. 2007. Morphological and endocrine study of the ovarian interstitial tissue of viscacha (*Lagostomus maximus maximus*). *Anatomical Record* 290: 788–794.
- Gimeno EJ, Barbeito CG. 2004. Glicobiología, una nueva dimensión para el estudio de la biología y la patología. *Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria LVIII*: 5–34.

- Gorelick FS, Sarras MP, Jamieson JD. 1982. Regional differences in lectin binding to colonic epithelium by fluorescent and electron microscopy. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 11: 1097- 1108.
- Gouyer V, Gottrand F, Desseyn JL. 2011. The Extraordinarily Complex but Highly Structured Organization of Intestinal Mucus-Gel Unveiled in Multicolor Images. *Plos One* 6: e18761.
- Gunawardene AR, Corfe BM, Staton CA. 2011. Classification and functions of enteroendocrine cells of the lower gastrointestinal tract. *International Journal of Experimental Pathology* 92: 219–231.
- Günther C, Neumann H, Neurath MF, Becker C. 2013. Apoptosis, necrosis and necroptosis: cell death regulation in the intestinal epithelium. *Gut* 62(7): 1062–1071.
- Hagen KB, Besselmann D, Cyrus-Eulenberger U, Vendl C, Ortmann S, Zingg R, Kienzle E, Kreuzer M, Hatt Jean-M, Clauss M. 2015. Digestive Physiology of the Plains Viscacha (*Lagostomus maximus*): A Large Herbivorous Hystricomorph Rodent. *Zoo Biology* 34: 345–359.
- Hamada H, Hiroi T, Nishiyama Y, Takahashi H, Masunaga Y, Hachimura S, Kaminogawa S, Takahashi-Iwanaga H, Iwanaga T, Kiyono H, et al. 2002. Identification of Multiple Isolated Lymphoid Follicles on the Antimesenteric Wall of the Mouse Small Intestine. *Journal of Immunology* 168: 57–64.
- Hanani M, Lonzon V, Miller SM, Faussone-Pellegrini MS. 1998. Visualization of interstitial cells of Cajal in the mouse colon by vital staining. *Cell Tissue Research* 292: 275–282.
- Hanani M, Farrugia G, Komuro T. 2005. Intercellular Coupling of Interstitial Cells of Cajal in the Digestive Tract. *International Review of Cytology* 242: 249–282.
- Hansen GH, Niels-Christiansen LL, Immerdal L, Hunziker W, Kenny AJ, Danielsen EM. 1999. Transcytosis of Immunoglobulin A in the Mouse Enterocyte Occurs Through Glycolipid Raft- and Rab17-Containing Compartments. *Gastroenterology* 116: 610–622.

- Hansen GH, Rasmussen K, Niels-Christiansen LL, Danielsen EM. 2009. Lipopolysaccharide-binding protein: localization in secretory granules of Paneth cells in the mouse small intestine. *Histochemistry and Cell Biology* 131: 727–732.
- Hansson GC. 2012. Role of mucus layers in gut infection and inflammation. *Current Opinion in Microbiology* 15: 57–62.
- Hosoyamada Y, Sakai T. 2007. Mechanical components of rat intestinal villi as revealed by ultrastructural analysis with special reference to the axial smooth muscle cells in the villi. *Archives of Histology and Cytology* 70: 107–116.
- Howe SE, Lickteig DJ, Plunkett KN, Ryerse JS, Konjufca V. 2014. The Uptake of Soluble and Particulate Antigens by Epithelial Cells in the Mouse Small Intestine. *PLOS ONE* 9(1): e86656.
- Hudson NP, Pearson GT, Kitamura N, Mayhew IG. 1999. An immunohistochemical study of interstitial cells of Cajal (ICC) in the equine gastrointestinal tract. *Research in Veterinary Science* 66: 265–271.
- Huizinga JD, Berezin I, Daniel EE, Chow E. 1990. Inhibitory innervation of colonic smooth muscle cells and interstitial cells of Cajal. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 68: 447–454.
- Huizinga JJ, Thuneberg L, Vanderwinden JM, Rumessen JJ. 1997. Interstitial cells of Cajal as targets for pharmacological intervention in gastrointestinal motor disorders. *Trends in Pharmacological Sciences* 18: 393–403.
- Isackson H, Ashley CC. 2014. Secretory functions of the gastrointestinal tract. *Surgery* 32(8): 396–403.
- Ishikawa K, Komuro T. 1996. Characterization of the interstitial cells associated with the submuscular plexus of the guinea-pig colon. *Anatomy and Embryology* 194: 49–55.
- Jackson JE, Branch LC, Villarreal D. 1996. *Lagostomus maximus*. *Mammal Species* 543: 1–6.

- Jensen F, Willis MA, Albamonte MS, Espinosa MB, Vitullo AD. 2006. Naturally suppressed apoptosis prevents follicular atresia and oocyte reserve decline in the adult ovary of *Lagostomus maximus* (Rodentia, Caviomorpha). *Reproduction* 132: 301–308.
- Jensen F, Willis MA, Leopardo NP, Espinosa MB, Vitullo D. 2008. The ovary of the gestating south American plains viscacha (*Lagostomus maximus*): Suppressed apoptosis and corpora lutea persistence. *Biology of Reproduction* 79: 240–246.
- Johansson MEV, Phillipson M, Petersson J, Velcich A, Holm L, Hansson GC. 2008. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *PNAS* 105: 15064–15069.
- Johansson MEV, Thomsson KA, Hansson GC. 2009. Proteomic analyses of the two mucus layers of the colon barrier reveal that their main component, the Muc2 mucin, is strongly bound to the Fcgbp protein. *Journal of Proteome Research* 8: 3549–3557.
- Johansson MEV, Ambort D, Pelaseyed T, Schitte A, Gustafsson JK, Ermund A, Subramani DB, Holmén-Larsson JM, Thomsson KA, Bergström JH, et al. 2011a. Composition and functional role of the mucus layers in the intestine. *Cellular and Molecular Life Science* 68: 3635–3641.
- Johansson ME, Larsson JM, Hansson GC. 2011b. The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host-microbial interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108: 4659–4665.
- Kamada N, Seo SU, Chen GY, Núñez G. 2013. Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. *Nature Reviews Immunology* 13: 321–335.
- Kardong KV. 2007. Vertebrados. Anatomía comparada, función, evolución. 4ª ed. Buenos Aires: McGraw Hill Interamericana. 800 p.
- Kim YS, Ho SB. 2010. Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. *Current Gastroenterology Reports* 12: 319–330.



- Kito Y, Ward SM, Sanders KM. 2005. Pacemaker potentials generated by interstitial cells of Cajal in the murine intestine. *American Journal of Physiology* 288: C710–C720.
- Klein S, Seidler B, Kettenberger A, Sibae A, Rohn M, Feil R, Allescher HD, Vanderwinden JM, Hofmann F, Schemann M, et al. 2013. Interstitial cells of Cajal integrate excitatory and inhibitory neurotransmission with intestinal slow-wave activity. *Nature Communications* 4: 1630.
- Knoop KA, Kumar N, Butler BR, Sakthivel SK, Taylor RT, Nochi T, Akiba H, Yagita H, Kiyono H, Williams IR. 2009. RANKL is necessary and sufficient to initiate development of antigen-sampling M cells in the intestinal epithelium. *Journal of Immunology* 183(9): 5738–5747.
- Koh SD, Sanders KM, Ward SM. 1998. Spontaneous electrical rhythmicity in cultured interstitial cells of Cajal from the murine small intestine. *Journal of Physiology* 513: 203–213.
- Komuro T, Hashimoto Y. 1990. Three-Dimensional Structure of the Rat Intestinal Wall (Mucosa and Submucosa). *Archives of Histology and Cytology* 53: 1–21.
- Komuro T. 1999. Comparative Morphology of Interstitial Cells of Cajal: Ultrastructural Characterization. *Microscopy Research and Technique* 47: 267–285.
- Komuro T. 2006. Structure and organization of interstitial cells of Cajal in the gastrointestinal tract. *Journal of Physiology* 576: 653–658.
- Korneva ZV, Bednyakov DA. 2011. Comparative characterization of the ultrastructure of intestinal epithelium of various sturgeon species. *Inland Water Biology* 4: 446–454.
- Kotzé SH, van der Merwe EL, O’Riain MJ. 2006. The Topography and Gross Anatomy of the Gastrointestinal Tract of the Cape Dune Mole-rat (*Bathyergus suillus*). *Anatomia, Histologia, Embryologia* 35: 259–264.

- Kotzé SH, van der Merwe EL, Ndou R, O’Riain MJ, Bennett NC. 2009. The Colonic Groove or Furrow: A Comparative Morphological Study of Six Species of African Mole-Rats (Rodentia, Bathyergidae). *Journal of Morphology* 270: 966–975.
- Kotzé SH, Van Der Merwe EL, Bennett NC, O’Riain MJ. 2010. The Comparative Anatomy of the Abdominal Gastrointestinal Tract of Six Species of African Mole-Rats (Rodentia, Bathyergidae). *Journal of Morphology* 271: 50–60.
- Kraehenbuhl JP, Neutra MR. 2000. Epithelial M cells: Differentiation and function. *Medical Microbiology and Immunology* 16: 301–332.
- Krause WJ. 2000. Brunner’s glands: A structural, histochemical and pathological profile. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry* 35: 255–367.
- Kyda JM, Cripps AW. 2008. Functional differences between M cells and enterocytes in sampling luminal antigens. *Vaccine* 26: 6221–6224.
- Larsson JM, Karlsson H, Sjövall H, Hansson GC. 2009. A complex, but uniform O-glycosylation of the human MUC2 mucin from colonic biopsies analyzed by nanoLC/MS<sup>n</sup>. *Glycobiology* 19: 756–766.
- Lecoin L, Gabella G, Douarin NL. 1996. Origin of the c-kit-positive interstitial cells in the avian bowel. *Development* 122: 725–733.
- Leis O, Madrid JF, Ballesta J, Hernandez F. 1997. N- and O-linked oligosaccharides in the secretory granules of rat Paneth cells: an ultrastructural cytochemical study. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 45: 285–293.
- Lev RA, Spicer SS. 1964. Specific staining of sulphate groups with Alcian Blue at low pH. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 12: 309–309.
- Liquori GE, Mastrodonato M, Mentino D, Scillitani G, Desantis S, Portincasa P, Ferri D. 2012. In situ characterization of O-linked glycans of Muc2 in mouse colon. *Acta Histochemica* 114: 723–732.

- Lison L. 1953. Histochemie et cytochimie animales. Principes et méthodes. Paris: Gauthier-Villars. 607 p.
- Llanos AC, Crespo JA. 1952. Ecología de la vizcacha (*Lagostomus maximus maximus* Blainville) en el nordeste de la provincia de Entre Ríos. Revista de Investigaciones Agrícolas 3: 289–378.
- Mabbott NA, Donaldson DS, Ohno H, Williams IR, Mahajan A. 2013. Microfold (M) cells: important immunosurveillance posts in the intestinal epithelium. Mucosal Immunology 6: 666–677.
- Maeda H, Yamagata A, Nishikawa S, Yoshinaga K, Kobayashi S, Nishi K, Nishikawa SI. 1992. Requirement of c-kit for development of intestinal pacemaker system. Development 116: 369–375.
- Malmberg EK, Pelaseyed T, Petersson AC, Seidler UE, De Jonge H, Riordan JR, Hansson GC. 2008. The C-terminus of the transmembrane mucin MUC17 binds to the scaffold protein PDZK1 that stably localizes it to the enterocyte apical membrane in the small intestine. Biochemical Journal 410: 283–289.
- Mantani Y, Nishida M, Yuasa H, Yamamoto K, Takahara EI, Omotehara T, Sanath Udayanga KG, Kawano J, Yokoyama T, Hoshi N, et al. 2014. Ultrastructural and histochemical study on the Paneth cells in the rat ascending colon. Anatomical Record 295: 1462–1471.
- Márquez SG, Galotta JM, Portiansky EL, Barbeito CG. 2006. Characterization of Interstitial Cells of Cajal in Bowel of Cattle (*Bos Taurus*). Veterinary Research Communications 30: 221–229.
- Márquez SG. 2010. Caracterización y distribución de las células intersticiales de Cajal en el tubo gastrointestinal durante el período fetal, lactante y adulto del bovino (*Bos Taurus*). Tesis Doctoral, UNLP. La Plata, Argentina.

- Márquez SG, Galotta JM, Gálvez GA, Portiansky EL, Barbeito CG. 2014. Presence of c-kit positive cells in fetal and adult bovine forestomachs. *Biotechnic & Histochemistry* 89: 591–601.
- Martinez-Menarguez JA, Ballesta J, Aviles M, Madrid JF, Castells MT. 1992. Influence of sulphate groups in the binding of peanut agglutinin. Histochemical demonstration with light- and electronmicroscopy. *Histochemical Journal* 24: 207–216.
- Martino NS, Zenuto RR, Busch C. 2007. Nutritional responses to different diet quality in the subterranean rodent *Ctenomys talarum* (tuco-tucos). *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular* 147: 974–982.
- Martoja R, Martoja-Pierson M. 1970. Técnicas de histología animal. Primera edición. Barcelona, España: Toray- Masson S.S.
- Mastrodonato M, Mentino D, Liquori GE, Ferri D. 2013. Histochemical characterization of the sialic acid residues in mouse colon mucins. *Microscopy Research and Technique* 76: 156–162.
- Mastrodonato M, Mentino D, Portincasa P, Calamita G, Liquori GE, Ferri D. 2014. High-fat diet alters the oligosaccharide chains of colon mucins. *Histochemistry and Cell Biology* 142: 449–459.
- Mazet B. 2015. Gastrointestinal motility and its enteric actors in mechanosensitivity: past and present. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 467: 191–200.
- Mazzone A, Farrugia G. 2007. Evolving Concepts in the Cellular Control of Gastrointestinal Motility: Neurogastroenterology and Enteric Sciences. *Gastroenterology Clinics of North America* 36: 499–513.
- Mc Manus JFA. 1948. Histological and histochemical uses of periodic acid. *Stain Technology* 23: 99–108.

- McDole JR, Wheeler LW, McDonald KG, Wang B, Konjufca V, Knoop KA, Newberry RD, Miller MJ. 2012. Goblet cells deliver luminal antigen to CD1031 dendritic cells in the small intestine. *Nature* 483: 345–349.
- McGuckin MA, Lindén SK, Sutton P, Florin TH. 2011. Mucin dynamics and enteric pathogens. *Nature Reviews Microbiology* 9: 265–278.
- Mess A, Ade M. 2005. Feeding biology of the dassierat *Pteromus typicus* in captivity. *Belgian Journal of Zoology* 135: 45–51.
- Min KW, Seo IS. 2003. Interstitial cells of Cajal in the human small intestine: Immunochemical and ultrastructural study. *Ultrastructural Pathology* 27: 67–78.
- Mitsui R, Komuro T. 2003. Distribution and ultrastructure of interstitial cells of Cajal in the gastric antrum of wild-type and Ws/Ws rats. *Anatomy and Embryology* 206: 453–460.
- Montuenga Badía L, Ruiz FJE, González AC. 2014. Técnicas en histología y biología celular. Segunda edición. Barcelona, España: Elsevier Masson.
- Moran AP, Gupta A, Joshi L. 2011. Sweet-talk role of host glycosylation in bacterial pathogenesis of the gastrointestinal tract. *Gut* 60: 1412–1425.
- Morini M, Bettini G, Preziosi R, Mandrioli L. 2004. C-kit gene product (CD117) immunoreactivity in canine and feline paraffin sections. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 52: 705–708.
- Mowry RW. 1963. The special value of methods that colour both acidic and vicinal hydroxyl groups in the histochemical study of mucins with revised directions for the colloidal iron stain, the use of Alcian blue 8GX, and their combination with the periodic acid-Schiff reaction. *Annals of the New York Academy of Sciences* 106: 402–423.
- National Research Council (USA). 2000. Coypu. In: Vietmeyer N, editor. *Microlivestock: little-known small animals with a promising economic future*. Washington DC: Office of International Affairs (OIA), National Academy Press. p 217–224.

- Navarro JL, Rosati VR, Fraire EC. 1997. Incidencia de vizcachas (*Lagostomus maximus*) en un cultivo de soja. *Mastozoología Neotropical* 4(2): 137–144.
- Nieuw Amerongen AV, Bolscher JGM, Bloemena E, Veerman ECI. 1998. Sulfomucins in the Human Body. *Biological Chemistry* 379: 1–18.
- Ördög T, Ward SM, Sanders KM. 1999. Interstitial cells of Cajal generate electrical slow waves in the murine stomach. *Journal of Physiology* 518: 257–269.
- Parillo F, Diverio S, Todini L, Fagioli O. 2001. Histochemical detection of the lectin-binding carbohydrates in the zona pellucida during oocyte growth in the wild boar (*Sus scrofa scrofa*). *Veterinary Research* 32: 581–590.
- Pawlina W. 2015. *Ross. Histología texto y atlas, correlación con biología celular y molecular*. 7ª edición. Wolters Kluwer Health. 1052 p.
- Pavone S, Gialletti R, Pepe M, Onofri A, Mandara MT. 2012. Histological and immunohistochemical studies of changes in myenteric plexuses and in interstitial cells of Cajal associated with equine colic. *Research in Veterinary Science* 93: 350–359.
- Pearse AGE. 1985. *Histochemistry: Theoretical and Applied*, Vol. 2. Edinburgh: Churchill Livingstone. 631 p.
- Pelaseyed T, Bergström JH, Gustafsson JK, Ermund A, Birchenough GMH, Schütte A, van der Post S, Svensson F, Rodríguez-Piñeiro AM, Nyström EE, et al. 2014. The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system. *Immunological Reviews* 260: 8–20.
- Pellicciari C. 2012. On the future contents of a small journal of histochemistry. *European Journal of Histochemistry* 56: e51.
- Pereira DL, Walters J, Bennett NC, Alagaili AN, Mohammed OB, Kotz SH. 2016. The Comparative Gastrointestinal Morphology of *Jaculus jaculus* (Rodentia) and *Paraechinus aethiopicus* (Erinaceomorpha). *Journal of Morphology* 277: 671–679.

- Peterson DA, McNulty NP, Guruge JL, Gordon JI. 2007. IgA response to symbiotic bacteria as a mediator of gut homeostasis. *Cell Host & Microbe* 2: 328–339.
- Petracioli A, Maioa N, Guarinoa FM, Scillitani G. 2013. Seasonal variation in glycoconjugates of the pedal glandular system of the rayed Mediterranean limpet, *Patella caerulea* (Gastropoda: Patellidae). *Zoology* 116: 186–196.
- Podolsky DK, Fournier DA, Lynch KE. 1986. Human Colonic Goblet Cells. *Journal of Clinical Investigation* 77: 1263–1271.
- Popescu LM, Ciontea SM, Cretoiu D, Hinescu ME, Radu E, Ionescu N, Ceausu M, Gherghiceanu M, Braga R.I, Vasilescu F, et al. 2005. Novel type of interstitial cell (Cajal-like) in human fallopian tube. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 9: 479–523.
- Porter EM, Bevins CL, Ghosh D, Ganz T. 2002. The multifaceted Paneth cell. *Cellular and Molecular Life Science* 58: 01–15.
- Publicover NG, Hammond EM, Sanders KM. 1993. Amplification of nitric oxide signaling by interstitial cells isolated from canine colon. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90: 2087–2091.
- Puig S, Videla F, Cona M, Monge S, Roig V. 1998. Diet of the vizcacha *Lagostomus maximus* (Rodentia, Chinchillidae), habitat preferences and food availability in Northern Patagonia, Argentina. *Mammalia* 62: 191–204.
- Ramón y Cajal S. 1911. *Histologie du systeme nerveux de l’homme et des vertébrés*. Paris: Maloine.
- Randall D, Burggren W, French K. 1998. *Ekert Fisiología Animal, Mecanismos y Adaptaciones*. 4ta edición. McGraw-Hill Interamericana, España, 928pp.
- Reber L, Da Silva CA, Frossard N. 2006. Stem cell factor and its receptor c-Kit as targets for inflammatory diseases. *European Journal of Pharmacology* 533: 327–340.



- Reid PE, Culling CFA, Dunn WL. 1973. Saponification induced increase in the periodic acid Schiff reaction in the gastrointestinal tract. Mechanism and distribution of the reactive substance. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 21: 473–482.
- Rhodes JM, Gallimore R, Elias E, Allan RN, Kennedy JF. 1985. Faecal mucus degrading glycosidases in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut* 26: 761–765.
- Richardson KC. 1958. Electronmicroscopic observations on the Auerbach's plexus in the rabbit, with special reference to the problem of smooth muscle innervation. *Developmental Dynamics* 103: 99–135.
- Rindi G, Leiter AB, Kopin AS, Bordi C, Solcia E. 2004. The “Normal” Endocrine Cell of the Gut Changing Concepts and New Evidences. *Annals New York Academy of Science* 1014: 1–12.
- Robbe C, Capon C, Coddeville B, Michalski JC. 2004. Structural diversity and specific distribution of O-glycans in normal human mucins along the intestinal tract. *Biochemical Journal* 384: 307–316.
- Robertson AM, Wright DP. 1997. Bacterial glycosulphatases and sul-phomucin degradation. *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology* 11: 361–366.
- Romera EP, Mohamed F, Filippa V, Fogal T, Domínguez S, Scardapane L, Piezzi R. 2005. Ultrastructural and immunocytochemical studies of the Viscacha (*Lagostomus maximus*) pituitary pars tuberalis. *Anatomical Record* 284: 431–438.
- Romera EP, Mohamed F, Fogal T, Domínguez S, Piezzi R, Scardapane L. 2010. Effect of the photoperiod and administration of melatonin on the pars tuberalis of (*Lagostomus maximus maximus*): An ultrastructural study. *Anatomical Record* 293: 871–878.
- Rumessen JJ, Vanderwinden JM, Rasmussen H, Hansen A, Horn T. 2009. Ultrastructure of interstitial cells of Cajal in myenteric plexus of human colon. *Cell and Tissue Research* 337: 197–212.

- Sahd L, Pereira DL, Bennett NC, Kotzé SH. 2017. Comparative gastrointestinal morphology of *Tachyoryctes splendens* (Ruppell, 1835) and *Heliophobius emini*, (Noack, 1894) two species of East African mole-rats. *Journal of Morphology* 278: 780–790.
- Sakaguchi E. 2003. Digestive strategies of small hindgut fermenters. *Animal Science Journal* 74: 327–337.
- Sanders KM. 1992. Ionic mechanisms of electrical rhythmicity in gastrointestinal smooth muscles. *Annual Review of Physiology* 54: 439–53.
- Sanders KM, Ördög T, Koh SD, Torihashi S, Ward SM. 1999. Development and plasticity of interstitial cells of Cajal. *Journal of Neurogastroenterology and Motility* 11: 311–338.
- Sanders KM, Koh SD, Ward SM. 2006. Interstitial cells of Cajal as pacemakers in the gastrointestinal tract. *Annual Review of Physiology* 68: 307–343.
- Sanders KM, Koh SD, Ro S, Ward SM. 2012. Regulation of gastrointestinal motility—insights from smooth muscle biology. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 9(11): 633–645.
- Sanders KM, Kito Y, Hwang SJ, Ward SM. 2016. Regulation of Gastrointestinal Smooth Muscle Function by Interstitial Cells. *Physiology* 31: 316–326.
- Sasselli V, Pachnis V, Burns AJ. 2012. The enteric nervous system. *Developmental Biology* 366: 64–73.
- Satoh Y, Yamano M, Matsuda M, Ono K. 1990. Ultrastructure of Paneth cells in the intestine of various mammals. *Journal of Electron Microscopy Technique* 16: 69–80.
- Schonhoff SE, Giel-Moloney M, Leiter AB. 2004. Minireview: Development and Differentiation of Gut Endocrine Cells. *Endocrinology* 145: 2639–2644.
- Schumacher U, Duku M, Katoh M, Jörns J, Krause WJ. 2004. Histochemical similarities of mucins produced by Brunner's glands and pyloric glands: A comparative study. *Anatomical Record* 278A: 540–550.

- Scillitani G, Zizza S, Liquori GE, Ferri D. 2007. Lectin histochemistry of gastrointestinal glycoconjugates in the greater horseshoe bat, *Rhinolophus ferrumequinum* (Schreber, 1774). *Acta Histochemica* 109: 347–357.
- Scillitani G, Mentino D. 2015. Comparative glycopattern analysis of mucins in the Brunner's glands of the guinea-pig and the house mouse (Rodentia). *Acta Histochemica* 117: 612–623.
- Skutelsky E, Moore RP, Alroy J. 1989. Lectin histochemistry of mammalian Brunner's glands. *Histochemistry* 90: 383–390.
- Smith TK, Reed JB, Sanders KM. 1989. Electrical pacemakers of canine proximal colon are functionally innervated by inhibitory motor neurons. *American Journal of Physiology* 256: 466–477.
- Smith HF, Fisher RE, Everett ML, Thomas AD, Bollinger RR. 2009. Comparative anatomy and phylogenetic distribution of the mammalian cecal appendix. *Journal of Evolutionary Biology* 22: 1984–1999.
- Smith HF, Parkerc W, Kotzé SH, Laurinea M. 2013. Multiple independent appearances of the cecal appendix in mammalian evolution and an investigation of related ecological and anatomical factors. *Comptes Rendus Palevol* 12: 339–354.
- Snipes RL, Hörnicke H, Björnhag G, Stahl W. 1988. Regional differences in hindgut structure and function in the nutria, *Myocastor coypus*. *Cell and Tissue Research* 252: 435–447.
- Sohal GS, Ali MM, Farooqui FA. 2002. A second source of precursor cells for the developing enteric nervous system and interstitial cells of Cajal. *International Journal of Developmental Neuroscience* 20: 619–626.
- Takahashi T, Sakaguchi E. 1998. Behaviors and nutritional importance of coprophagy in captive adult and young nutrias (*Myocastor coypus*). *Journal of Comparative Physiology B* 168: 281–288.

- Takahashi T, Sakaguchi E. 2000. Role of the furrow of the proximal colon in the production of soft and hard feces in nutrias, *Myocastor coypus*. Journal of Comparative Physiology B 170: 531–535.
- Takahashi T, Sakaguchi E. 2006. Transport of bacteria across and along the large intestinal lumen of guinea pigs. Journal of Comparative Physiology B 176: 173–178.
- Takashima S, Gold D, Hartenstein V. 2013. Stem cells and lineages of the intestine: a developmental and evolutionary perspective. Development Genes and Evolution 223: 85–102.
- Takehana K., Mast J, Yamaguchi M, Kobayashi A, Yamada O, Kuroda M, Park YS, Iwasa K, Abe M. 1998. Fine Structural and Histochemical Study of Equine Paneth Cells. Anatomia, Histologia, Embryologia 27: 125–129.
- Takehana K, Ueda Eerdunchaolu H, Kobayashi A, Iwasa K, Sou K. 2000. A histochemical study of the camel (*Camelus bactrianus*) duodenal glands. The Journal of Veterinary Medical Science 62: 449–452.
- Taupin D, Podolsky DK. 2003. Trefoil factors: initiators of mucosal healing. Nature Reviews Molecular Cell Biology 4: 721–733.
- Thuneberg L. 1982. Interstitial cells of Cajal: intestinal pacemaker cells? Advances in Anatomy: Embryology and Cell Biology 71: 1–130.
- Tootian Z, Sadeghinezhad J, Sheibani MT, Fazelipour S, De Sordi N, Chiocchetti R. 2013. Histological and mucin histochemical study of the small intestine of the Persian squirrel (*Sciurus anomalus*). Anatomical Science International 88: 38–45.
- Torihashi S, Gerthoffer WT, Kobayashi S, Sanders KM. 1994. Identification and classification of interstitial cells in the canine proximal colon by ultrastructure and immunocytochemistry. Histochemistry 101: 169–183.
- Torihashi S, Horisawa M, Watanabe Y. 1999. c-Kit immunoreactive interstitial cells in the human gastrointestinal tract. Journal of the Autonomic Nervous System 75: 38–50.

- Tuma P, Hubbard AL. 2003. Transcytosis: Crossing Cellular Barriers. *Physiological Reviews* 83: 871–932.
- Turner JR. 2009. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nature Reviews Immunology* 9: 799–809.
- Vaishnava S, Behrendt CL, Ismaila AS, Eckmannb L, Hooper LV. 2008. Paneth cells directly sense gut commensals and maintain homeostasis at the intestinal host-microbial interface. *PNAS* 105: 20858–20863.
- Vaishnava S, Yamamoto M, Severson KM, Ruhn KA, Yu X, Koren O, Ley R, Wakeland EK, Hooper LV. 2011. The Antibacterial Lectin RegIII $\gamma$  Promotes the Spatial Segregation of Microbiota and Host in the Intestine. *Science* 334: 255–258.
- van Baal JOAM, Van de Vijver KK, Nieuwlandc R, van Noordend CJF, van Driel WJ, Sturkc A, Kenter GG, Rikkert LG, Loka CAR. 2017. The histophysiology and pathophysiology of the peritoneum. *Tissue and Cell* 49: 95–105.
- van Passel MWJ, Kant R, Zoetendal EG, Plugge CM, Derrien M, Malfatti SA, Chain PSG, Woyke T, Palva A, de Vos WM, et al. 2011. The genome of *Akkermansia muciniphila*, a dedicated intestinal mucin degrader, and its use in exploring intestinal metagenomes. *PLoS ONE* 6: e16876.
- Vanderwinden JM, Rumessen JJ, Bernex F, Schiffmann SN, Panthier JJ. 2000. Distribution and ultrastructure of interstitial cells of Cajal in the mouse colon, using antibodies to Kit and Kit<sup>W-lacZ</sup> mice. *Cell Tissue Research* 302: 155–170.
- Vásquez Cachay ME, Pebe Gomez E, Rodriguez Gutierrez JL, Lira Mejia B, Falcon Perez N, Zanuzzi CN, Barbeito C. 2014. Paneth cell identification in the small intestine of guinea pig offsprings (*Cavia porcellus*). *Anatomical Record* 297: 856–863.

- Vassallo AI, Antenucci, D. 2015. Biology of caviomorph rodents: diversity and evolution. Series A: Mammalogical Research, vol. 1. Sociedad Argentina para el Estudio de los Mamíferos (SAREM), Mendoza, 329 pp.
- Verdiglione R, Mamola CL, Filotto U. 2002. Glycoconjugate histochemistry of bovine Brunner glands. *Annals of Anatomy Anatomischer Anzeiger* 184: 61–69.
- Villarreal D, Clark KL, Branch LC, Hierro JL, Machicote M. 2008. Alteration of ecosystem structure by a burrowing herbivore, the plains vizcacha (*Lagostomus maximus*). *Journal of Mammalogy* 89(3): 700–711.
- Volz D, Reid PE, Park CM, Owen DA, Dunn WL. 1987. A new histochemical method for the selective periodate oxidation of total tissue sialic acids. *Histochemical Journal* 19: 311–318.
- Walters J, Marais S, Johnson O, Bennett NC, Alagaili AN, Mohammed OB, Kotzé SH. 2014. The comparative gastrointestinal morphology of five species of muroid rodents found in Saudi Arabia. *Journal of Morphology* 275(9): 980–90.
- Wang XY, Sanders KM, Ward SM. 1999. Intimate relationship between interstitial cells of Cajal and enteric nerves in the guinea-pig small intestine. *Cell Tissue Research* 295: 247–256.
- Ward SM, Morris G, Reese L, Wang X-Y, Sanders KM. 1998. Interstitial cells of Cajal mediate enteric inhibitory neurotransmission in the lower esophageal and pyloric sphincters. *Gastroenterology* 115: 314–329.
- Ward SM, Beckett EAH, Wang XY, Baker F, Khoyi M, Sanders KM. 2000. Interstitial Cells of Cajal Mediate Cholinergic Neurotransmission from Enteric Motor Neurons. *The Journal of Neuroscience* 20(4): 1393–1403.
- Ward SM, Sanders KM. 2001. Interstitial Cells of Cajal: Primary Targets of Enteric Motor Innervation. *Anatomical Record* 262: 125–135.

- Ward SM, McLaren GJ, Sanders KM. 2006. Interstitial cells of Cajal in the deep muscular plexus mediate enteric motor neurotransmission in the mouse small intestine. *Journal of Physiology* 573: 147–159.
- Wedel T, Spiegler J, Soellner S, Roblick UJ, Schiedeck THK, Bruch HP, Krammer HJ. 2002. Enteric Nerves and Interstitial Cells of Cajal Are Altered in Patients With Slow-Transit Constipation and Megacolon. *Gastroenterology* 123: 1459–1467.
- Won KJ, Sanders KM, Ward SM. 2005. Interstitial cells of Cajal mediate mechanosensitive responses in the stomach. *PNAS* 102: 14913–14918.
- Zanuzzi CN, Fontana PA, Barbeito CG, Portiansky EL, Gimeno EJ. 2008. Paneth cells: histochemical and morphometric study in control and *Solanum glaucophyllum* intoxicated rabbits. *European Journal of Histochemistry* 52: 93–100.
- Zanuzzi CN, Barbeito CG, Ortíz ML, Lozza FA, Fontana PA, Portiansky EL, Gimeno EJ. 2010. Glycoconjugate histochemistry in the small and large intestine of normal and *Solanum glaucophyllum*-intoxicated rabbits. *Research in Veterinary Science* 89: 214–222.
- Zuñiga, M, Tur Marí J, Milocco S, Pineiro R. 2001. *Ciencia y Tecnología en Protección y Experimentación Animal*. Madrid: Editorial McGraw-Hill Interamericana, 386–418.



**Tabla 14.** Comparación estadística del área de las células c-kit positivas entre las distintas regiones anatómicas del tracto intestinal de *L. maximus*

ANOVA		
El valor $P < 0,0001$ , considerado extremadamente significativo. Por lo tanto, la variación entre los promedios de las columnas es significativamente mayor que lo esperado por azar.		
Test de Bonferroni	Diferencia	Valor P
Duodeno vs. Yeyuno	23,03	ns 0,8566
Duodeno vs. Íleon	10,58	ns > 0,9999
Duodeno vs. Ciego	2,377	ns > 0,9999
Duodeno vs. Colon	-38,22	* 0,0209
Duodeno vs. Surco	-65,80	**** < 0,0001
Duodeno vs. Recto	-48,88	** 0,0015
Yeyuno vs. Íleon	-12,45	ns > 0,9999
Yeyuno vs. Ciego	-20,65	ns > 0,9999
Yeyuno vs. Colon	-61,25	**** < 0,0001
Yeyuno vs. Surco	-88,82	**** < 0,0001
Yeyuno vs. Recto	-71,90	**** < 0,0001
Íleon vs. Ciego	-8,204	ns > 0,9999
Íleon vs. Colon	-48,80	** 0,0036
Íleon vs. Surco	-76,38	**** < 0,0001
Íleon vs. Recto	-59,46	*** 0,0003
Ciego vs. Colon	-40,60	* 0,0306
Ciego vs. Surco	-68,17	**** < 0,0001
Ciego vs. Recto	-51,25	** 0,0028
Colon vs. Surco	-27,57	ns 0,5616
Colon vs. Recto	-10,65	ns > 0,9999
Surco vs. Recto	16,92	ns > 0,9999

Ns, no significativo ( $P > 0,05$ ); \*  $P \leq 0,05$ ; \*\*  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $P \leq 0,0001$ .

**Tabla 15.** Comparación estadística del eje mayor de las células c-kit positivas entre las distintas regiones anatómicas del tracto intestinal de *L. maximus*

ANOVA		
El valor $P < 0,0001$ , considerado extremadamente significativo. Por lo tanto, la variación entre los promedios de las columnas es significativamente mayor que lo esperado por azar.		
Test de Bonferroni	Diferencia	Valor P
Duodeno vs. Yeyuno	3,249	ns 0,5548
Duodeno vs. Íleon	0,03583	ns > 0,9999
Duodeno vs. Ciego	2,305	ns > 0,9999
Duodeno vs. Colon	-0,4233	ns > 0,9999
Duodeno vs. Surco	-5,658	** 0,0068
Duodeno vs. Recto	-4,907	* 0,0328
Yeyuno vs. Íleon	-3,213	ns 0,9533
Yeyuno vs. Ciego	-0,9443	ns > 0,9999
Yeyuno vs. Colon	-3,672	ns 0,4037
Yeyuno vs. Surco	-8,907	**** < 0,0001
Yeyuno vs. Recto	-8,156	**** < 0,0001
Íleon vs. Ciego	2,269	ns > 0,9999
Íleon vs. Colon	-0,4592	ns > 0,9999
Íleon vs. Surco	-5,694	* 0,0180
Íleon vs. Recto	-4,943	ns 0,0716
Ciego vs. Colon	-2,728	ns > 0,9999
Ciego vs. Surco	-7,963	*** 0,0002
Ciego vs. Recto	-7,211	*** 0,0008
Colon vs. Surco	-5,235	* 0,0321
Colon vs. Recto	-4,483	ns 0,1265
Surco vs. Recto	0,7513	ns > 0,9999

Ns, no significativo ( $P > 0,05$ ); \*  $P \leq 0,05$ ; \*\*  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $P \leq 0,0001$ .

**Tabla 16.** Comparación estadística del eje menor de las células c-kit positivas entre las distintas regiones anatómicas del tracto intestinal de *L. maximus*

<b>ANOVA</b>		
El valor $P < 0,0001$ , considerado extremadamente significativo. Por lo tanto, la variación entre los promedios de las columnas es significativamente mayor que lo esperado por azar.		
<b>Test de Bonferroni</b>	Diferencia	Valor P
Duodeno vs. Yeyuno	1,271	ns > 0,9999
Duodeno vs. Íleon	0,7671	ns > 0,9999
Duodeno vs. Ciego	0,02833	ns > 0,9999
Duodeno vs. Colon	-1,647	ns 0,7789
Duodeno vs. Surco	-2,964	* 0,0100
Duodeno vs. Recto	-3,678	*** 0,0005
Yeyuno vs. Íleon	-0,5035	ns > 0,9999
Yeyuno vs. Ciego	-1,242	ns > 0,9999
Yeyuno vs. Colon	-2,918	* 0,0173
Yeyuno vs. Surco	-4,235	*** 0,0001
Yeyuno vs. Recto	-4,948	**** < 0,0001
Íleon vs. Ciego	-0,7388	ns > 0,9999
Íleon vs. Colon	-2,414	ns 0,1319
Íleon vs. Surco	-3,731	** 0,0016
Íleon vs. Recto	-4,445	**** < 0,0001
Ciego vs. Colon	-1,676	ns > 0,9999
Ciego vs. Surco	-2,993	* 0,0247
Ciego vs. Recto	-3,706	** 0,0018
Colon vs. Surco	-1,317	ns > 0,9999
Colon vs. Recto	-2,031	ns 0,4260
Surco vs. Recto	-0,7138	ns > 0,9999

Ns, no significativo ( $P > 0,05$ ); \*  $P \leq 0,05$ ; \*\*  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $P \leq 0,0001$ .

**Tabla 17.** Comparación estadística del área, eje mayor y eje menor de las células c-kit positivas entre las distintas regiones anatómicas del tracto intestinal de *L. maximus*

Órganos	Valor P		
	Área	Eje mayor	Eje menor
Duodeno vs. Yeyuno	ns 0,8566	ns 0,5548	ns > 0,9999
Duodeno vs. Íleon	ns > 0,9999	ns > 0,9999	ns > 0,9999
Duodeno vs. Ciego	ns > 0,9999	ns > 0,9999	ns > 0,9999
Duodeno vs. Colon	* 0,0209	ns > 0,9999	ns 0,7789
Duodeno vs. Surco	**** < 0,0001	** 0,0068	* 0,0100
Duodeno vs. Recto	** 0,0015	* 0,0328	*** 0,0005
Yeyuno vs. Íleon	ns > 0,9999	ns 0,9533	ns > 0,9999
Yeyuno vs. Ciego	ns > 0,9999	ns > 0,9999	ns > 0,9999
Yeyuno vs. Colon	**** < 0,0001	ns 0,4037	* 0,0173
Yeyuno vs. Surco	**** < 0,0001	**** < 0,0001	*** 0,0001
Yeyuno vs. Recto	**** < 0,0001	**** < 0,0001	**** < 0,0001
Íleon vs. Ciego	ns > 0,9999	ns > 0,9999	ns > 0,9999
Íleon vs. Colon	** 0,0036	ns > 0,9999	ns 0,1319
Íleon vs. Surco	**** < 0,0001	* 0,0180	** 0,0016
Íleon vs. Recto	*** 0,0003	ns 0,0716	**** < 0,0001
Ciego vs. Colon	* 0,0306	ns > 0,9999	ns > 0,9999
Ciego vs. Surco	**** < 0,0001	*** 0,0002	* 0,0247
Ciego vs. Recto	** 0,0028	*** 0,0008	** 0,0018
Colon vs. Surco	ns 0,5616	* 0,0321	ns > 0,9999
Colon vs. Recto	ns > 0,9999	ns 0,1265	ns 0,4260
Surco vs. Recto	ns > 0,9999	ns > 0,9999	ns > 0,9999

Ns, no significativo ( $P > 0,05$ ); \*  $P \leq 0,05$ ; \*\*  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $P \leq 0,0001$ .